

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre Eau terre Environnement

Récupération et réutilisation des rejets issus de la production de bioplastique pour la croissance des microorganismes (*C. nector*) producteurs de PHA

Par :

Yazid SITELI

Mémoire présenté pour l'obtention du grade Maitre ès sciences, M. Sc en sciences de l'eau
(INRS)

Et du Master en sciences de l'eau et de l'environnement
(ISHÉDD)

Jury d'évaluation :

Examineur Interne	Jeans François Blais INRS-ETE, Canada
Examineur Externe	Manuel Rodriguez Université Laval, Canada
Directeur de recherche	Patrick Drogui INRS-ETE, Canada
Co-directeur de recherche	Rajeshwar Dayal Tyagi INRS-ETE, Canada
Co-directeur de recherche	Kamal El haji ISHÉDD, Maroc

Juin 2020

“Look deep into nature, and then you will understand everything better”

Albert Einstein

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements aux personnes qui m'ont soutenu et qui ont énormément contribué à la préparation de ce mémoire. Tout d'abord, je voudrais exprimer ma gratitude et mes sincères remerciements à M. **Patrick DROGUI** mon directeur de recherche, qui a toujours été attentif et très disponible tout au long de mes travaux de recherche et la production de ce mémoire de Maitrise.

Je remercie M. **Kamal El Haji**, directeur général de l'Institut supérieur des hautes études en développement durable (ISHÉDD), pour sa confiance, ses conseils et sa disponibilité.

Je tiens particulièrement à adresser mes remerciements à M. **Rajeshwar Dayal Tyagi**, professeur à l'INRS-ETE, pour sa supervision, sa parfaite collaboration et sa patience tout au long de la réalisation du projet de recherche.

Je voudrais exprimer ma gratitude à M. **Manuel Rodriguez** et à M. **Jean François Blais**, qui ont eu la gentillesse de lire et d'améliorer ce travail.

Je remercie également M. **Sravan Yellapu Kumar** qui n'a ménagé aucun effort pour me guider et m'aider à accomplir ce travail.

Je remercie également les collaborateurs de l'INRS-ETE qui m'ont aidé directement ou indirectement dans mes démarches administratives, techniques et analytiques.

Des remerciements particuliers vont à **Rajwinder kaur**, **Bharti Bahdana**, **Anita Talan**, **Bhagyashree Tiwari**, **Lalit Kumar** et **Bhoomika Yadav** pour leur aide et leur gentillesse.

Je n'oublie pas mes parents pour leur soutien, leur encouragement et leur grande patience. Enfin, merci à tous les parents et amis qui m'ont toujours soutenu et encouragé lors de la préparation de ce mémoire.

RÉSUMÉ

L'utilisation des bioplastiques peut être entravée par des coûts de production relativement élevés par rapport aux coûts de production de plastiques conventionnels. Le coût des matières premières (carbone et nutriments) peut représenter jusqu'à 40% du coût total de production des bioplastiques (PHA : polyhydroxyalkanoate). Diverses recherches ont été effectuées en utilisant des sources de carbone résiduel pour réduire les coûts de production. C'est dans cette perspective que ces travaux de recherche ont été initiés en vue d'étudier la possibilité de réutiliser les nutriments et carbone issus du bouillon fermenté.

La fermentation a été effectuée en utilisant un excès de source de carbone et en limitant les nutriments. Suite à la fermentation, le bouillon fermenté a été recueilli et centrifugé pour une séparation solide/liquide. La biomasse (fraction solide) a été par la suite séchée et le PHA a été extrait. Le surnageant (fraction liquide) riche en nutriments et en carbone a été utilisé comme milieu de culture. Différentes stratégies de fermentation ont été effectuées en utilisant des nutriments résiduels présents dans le bouillon fermenté.

Des tests ont été successivement effectués en fioles Erlenmeyer agitées de 300 mL et dans des fermenteurs de 5L à 7L de capacité dans l'optique d'étudier l'impact de certains paramètres d'opération (ex. concentrations en carbone/nutriments et mode d'alimentation discontinue) sur la production de PHA en utilisant *Curpriavidus necator*. Le surnageant de bouillons fermentés issus de différentes sources de carbone (telles que les boues secondaires de pâte et papiers et d'huiles de cuisson usagées) a été utilisé comme milieu culture au cours de la fermentation afin de déterminer l'impact sur la biomasse et la teneur en PHA. Les tests en Erlenmeyer (flacons agités) ont permis d'identifier les meilleures conditions d'opération qui ont été par la suite appliquées en bioréacteur. Différentes analyses ont été réalisées tels que la détermination des matières en suspension (MES), le dénombrement bactérien, l'estimation des huiles et l'accumulation du PHA. Lors des tests en fioles Erlenmeyer, les teneurs maximales en PHA de 23,4 et 25% (p/p) ont été enregistrées dans une dilution à 50% du surnageant issu du bouillon fermenté sans ajout de minéraux et dans une dilution de 25% sans ajout de minéraux.

Une dernière étape a consisté à tester simultanément trois bioréacteurs respectivement alimentés avec les milieux de cultures suivants : **i)** 50%(v/v) du surnageant issu du bouillon fermenté + huiles de cuisson usagées et ce, sans ajout des minéraux à 0h (**Fermenteur-A**) ; **ii)** 50%(v/v) du surnageant issu du bouillon fermenté + huiles de cuisson usagées et ce, avec ajout de minéraux à 0h (**Fermenteur-B**) ; **iii)** 25%(v/v) du surnageant issu du bouillon fermenté + huiles de cuisson usagées avec un ajout de minéraux à 0h (**Fermenteur-C**). Le pH (6.8) et la température (30°C) et la concentration en oxygène dissous (30 – 50 %(v/v)) ont été contrôlés

et maintenus constants lors de cette série d'expériences. Un rendement maximal de PHA a été obtenu au sein du **Fermenteur-B**. Les rendements du PHA enregistrés dans les **Fermenteurs-A** (3 L de volume utile), **Fermenteur-B** (3 L de volume utile) et **Fermenteur-C** (4 L de volume utile) sont respectivement de 59%, 76% et 41%.

Mots clés : Bouillon fermenté, PHA, Flacon par agitation, séparation solide-liquide

ABSTRACT

The widespread use of bioplastics can be affected by high production costs compared to conventional plastics. The cost of raw materials (carbon and nutrients) can account for up to 40% of the total production cost of bioplastics (PHA: Polyhydroxyalkanoate). Various studies have been carried out using residual carbon sources to reduce this production expense. In this perspective, this research was initiated to investigate the possibility of reusing nutrients and carbon from fermented broth.

Fermentation was carried out using an excess carbon source and limiting nutrients. Subsequent to fermentation, the fermented broth was collected and centrifuged for solid/liquid separation. The biomass (solid fraction) was then dried and the PHA was extracted. The supernatant (liquid fraction) rich in nutrients and carbon was used as culture medium. Different fermentation strategies were carried out using residual nutrients present in the fermented broth.

Tests were successively carried out in 300 mL Erlenmeyer flasks and in 5L to 7L capacity fermenters in order to study how certain operating parameters (e.g. carbon/nutrient concentrations and batch feeding mode) may affect PHA production using as strain *Curpriavidus necator*. The fermented broth's supernatant obtained from different carbon sources (such as secondary pulp and paper sludge and waste cooking oil) was used as a culture medium during fermentation to determine the impact on biomass and PHA content. Erlenmeyer tests (shake flasks) enabled the selection of the best operating conditions, which were then implemented in bioreactor. Different analysis was performed such as determination of suspended solids (SS), cell count, oil estimation and PHA accumulation. In Erlenmeyers, maximum PHA levels of 23 and 25% (w/w) were respectively estimated in 50% supernatant dilution and 25% dilution, both without minerals. Finally, three bioreactors were simultaneously fed with the following culture media: i) 50% (v/v) supernatant + waste cooking oils with no minerals at 0h (Fermenter-A); ii) 50% (v/v) supernatant + waste cooking oils with minerals at 0h (Fermenter-B); iii) 25% (v/v) supernatant + waste cooking oils with minerals at 0h (Fermenter-C). The pH (6.8), temperature (30C) and dissolved oxygen concentration (30-50 %) were controlled and kept constant during this set of experiments. The highest PHA yield was obtained in Fermenter-B. The PHA yields obtained in Fermenter-A (3 L working volume), Fermenter-B (3 L working volume) and Fermenter-C (4 L working volume) were respectively as follow 59%, 76% and 41%.

Key words: Fermented broth, PHA, Shake flask, solid-liquid separation

TABLES DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	IV
RÉSUMÉ.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
TABLES DES MATIERES.....	IX
LISTE DES ABREVIATIONS.....	XII
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XIV
INTRODUCTION	1
1. REVUE DE LITTERATURE	3
1.1. Bioplastiques :.....	3
1.2. Polyhydroxyalcanoate (PHA) :.....	3
1.3. Structure et biodégradabilité :.....	4
1.4. Microorganismes producteurs du PHA :.....	4
1.5. Biosynthèse du PHA :.....	6
1.6. Caractérisation du PHA :.....	7
1.7. Accumulation du PHA :.....	8
1.8. La production du PHA par des cultures bactériennes pures :.....	8
1.9. Effet des paramètres opérationnels sur la production de PHA	9
1.10. Récupération du PHA :.....	10
1.11. Pré-traitements :.....	10
1.12. Les techniques de récupération :.....	12
1.12.1. La perturbation chimique :.....	12
1.13. L'extraction du PHA :.....	14
1.14. Recyclage du surnageant du bouillon fermenté :.....	14
1.15. PROBLEMATIQUE DE RECHERCHE.....	16
1.17. OBJECTIFS ET ORIGINALITE DE LA RECHERCHE	17
1.17.1. Objectifs :.....	17
1.18.2. Originalité :.....	17
2. MATERIEL ET METHODE.....	18
2.1. Collecte des échantillons et prétraitement.....	18
2.2. Prétraitements des échantillons	19
2.3. La caractérisation du surnageant.....	20
2.3.1. Demande chimique en oxygène (DCO) :.....	20

2.3.2.	pH.....	21
2.3.3.	Quantification des huiles.....	21
2.3.4.	Carbone total.....	21
2.3.5.	Métaux.....	21
2.3.6.	Estimation des protéines.....	21
2.4.	Étude en Erlenmeyer pour recycler le surnageant pour la production du PHA.....	22
2.4.1.	La culture microbienne.....	22
2.4.2.	Préculture 1.....	23
2.4.3.	Préculture 2.....	23
2.5.	Plan expérimentale de l'étude erlenmeyer.....	24
2.6.	Étude fermenteur pour recycler le surnageant de la production du PHA.....	24
2.6.1.	Préparation des médias :.....	24
2.7.	Méthode analytique.....	24
2.7.1.	Analyse UFC :.....	24
2.7.2.	Matière en suspension :.....	25
2.7.3.	La quantification du PHA.....	25
2.8.	La préparation des fermenteurs :.....	26
2.8.1.	Étalonnage :.....	26
2.8.2.	Préparation des médias :.....	26
2.8.3.	Précautions avant la stérilisation :.....	26
2.9.	Calcul.....	28
3.	RESULTATS ET DISCUSSION.....	29
3.1.	L'analyse chimique des différents paramètres du surnageant du bouillon fermenté : 29	
3.2.	Recyclage du surnageant du bouillon fermenté pour la production du PHA en fonction du ratio Eau/Surnageant (V/V) :.....	31
3.2.1.	L'évolution des microorganismes dans les fioles.....	32
3.2.2.	Fluctuation des teneurs en MES des flacons :.....	33
3.2.3.	La réduction des huiles dans les fioles :.....	34
3.2.4.	L'accumulation des PHA :.....	35
3.3.	Étude de fermentation dans des fermenteurs à 5L*2 et 7L.....	35
3.3.1.	Fermenteur A : 50 % du surnageant sans addition des minéraux à 0h.....	37
3.3.2.	Fermenteur B : 50% du surnageant avec une addition des minéraux à 0h.....	38
3.3.3.	Fermenteur C : 25% du surnageant avec addition des minéraux à 0h.....	39
	CONCLUSION.....	40
	RECOMMANDATIONS.....	41

RÉFÉRENCES.....	42
Annexe 1	47

LISTE DES ABREVIATIONS

- PHA Polyhydroxyalkanoate
- MES Matière en suspension
- UFC Unité formant de colonie
- PGA L'acide polyglycolique
- PLA Polylactique
- PCL Polycaprolactone
- PHB Polyhydroxybutyrate
- NPCM non-PHA cellular mass
- AGL Acide Gras Libre

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure du PHA.....	4
Figure 2: Autoclave	19
Figure 3: La centrifugeuse du laboratoire.....	20
Figure 4: Bouillon fermenté après 72h de fermentation sans contamination microbienne et vue microscopique	25
Figure 5: Fermenteur à 7L du laboratoire ETE.....	27
Figure 6: La variation d'UFC en fonction de différentes concentrations en surnageant du bouillon du fermenteur (LOG(UFC/mL)).....	32
Figure 7: Étude Erlenmeyer.....	33
Figure 8: La variation des MES en fonction de différentes concentrations en surnageant du bouillon du fermenteur (g/L).....	33
Figure 9: la variation des huiles en fonction de différentes concentrations en surnageant du bouillon du fermenteur (g/L).....	34
Figure 10: La variation de l'accumulation du PHA en fonction de différentes concentrations en surnageant du bouillon du fermenteur (%)	35
Figure 11: Évolution de la biomasse microbienne (UFC/mL), de MES (g/L) et de PHA (% (w/w) et g/L) au cours du temps d'incubation lorsque des huiles de cuisson usagées (environ 11 g/L) sont initialement utilisées comme substrat organique ainsi que 50%(v/v) de surnageant issu du bouillon fermenté et ce, sans ajout de minéraux.	37
Figure 12: Évolution de la biomasse microbienne (UFC/mL), de MES (g/L) et de PHA (% (w/w) et g/L) au cours du temps d'incubation lorsque des huiles de cuisson usagées (environ 11 g/L) sont initialement utilisées comme substrat organique ainsi que 50%(v/v) de surnageant issu du bouillon fermenté et ce, avec ajout de minéraux (au début de la fermentation).	38
Figure 13: Évolution de la biomasse microbienne (UFC/mL), de MES (g/L) et de PHA (% (w/w) et g/L) au cours du temps d'incubation lorsque des huiles de cuisson usagées (environ 11 g/L) sont initialement utilisées comme substrat organique ainsi que 25%(v/v) de surnageant issu du bouillon fermenté et ce, avec ajout de minéraux (au début de la fermentation).	39

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: La production du PHA par différents microorganismes en utilisant une variété de source en carbone	5
Tableau 2: Paramètres physiques des différents polymères	8
Tableau 3: Étude antérieure de la production du PHA sous différentes conditions .	18
Tableau 4: Caractéristique chimique du Bioliq et du Glycérol brute	29
Tableau 5: Analyse chimique du surnageant du bouillon fermenté	30
Tableau 6: Étude en Erlenmeyer sous différentes conditions.....	31
Tableau 7: Analyse chimique du bouillon fermenté	47

INTRODUCTION

Les plastiques conventionnelles présentent un impact négatif pour l'environnement. Leurs durées de vie ont été estimées selon plusieurs études à environ 200 ans (Kourmentza *et al.*, 2017). La dégradation des matières en plastique contribue à l'augmentation des gaz à l'effet de serre.

Afin de régler ce fléau, l'intérêt des chercheurs a été axé vers des substituts biodégradables. Durant les dernières décennies, plusieurs articles ont été publiés sur les développements des techniques de production de plastiques biodégradables (Koller, 2017). La biodégradabilité du PHA qui ne nécessite pas une procédure pour la catalyser la réaction de la dégradation comparativement aux matières en plastiques conventionnelles. En effet, le polyhydroxyalcanoate (PHA) a été classé comme un polymère renouvelable, biodégradable et biosourcé. Il est considéré comme un polymère vert avec l'acide poly lactique (PLA) et le poly butylène succinate (PBS). Ils sont censés substituer les plastiques conventionnelle tout en ayant des propriétés physico-chimique, thermique et mécanique similaires, à celles du polypropylène (PP) et du polyéthylène à basse densité (LDPE) (Koller, 2017) et (Rummel *et al.*, 2016).

Il existe plusieurs microorganismes qui sont capables d'accumuler les PHAs sous forme de granules intracellulaires (Bactérie, champignon et algue). Ces PHA sont considérés comme une réserve de carbone et d'énergie pour le microorganisme. L'accumulation des PHAs est favorisée dans les conditions de limitations des éléments nutritifs alors que le carbone est en excès.

En fonction de leurs caractéristiques, les PHAs peuvent être exploités dans une panoplie d'applications, notamment dans les secteurs de la pharmacie, de l'agriculture, de l'automobile, de la médecine, du textile et de l'emballage (Braunegg *et al.*, 2004).

En ayant des propriétés thermoplastiques et biodégradables, les PHAs peuvent être considérés comme un meilleur concurrent pour remplacer les polymères dérivés de la pétrochimie dans le secteur d'emballage (Ward *et al.*, 2006).

La production des PHAs à l'échelle industrielle présente des coûts de fabrication plus élevée par rapport aux plastiques issus de la pétrochimie. Cela est dû principalement à la pureté des substrats, son processus de production et au coûts élevés des réactifs de récupération (Tay *et al.*, 2010). La demande pour les PHAs est en augmentation en raison de son utilisation dans les différentes applications mentionnées. Par conséquent, le marché de bioplastiques devrait atteindre 93.5 millions de dollars US d'ici 2021 (Singh *et al.*, 2019). En raison de ses utilités mentionnées précédemment, nombreuses industries ont commencé à produire le PHA et ont commencé à chercher des moyens afin de réduire les couts de production (Koller, 2017).

Plusieurs techniques ont été étudiées et développées afin de récupérer les granules du PHA dans les cellules. Les techniques d'extraction utilisées nécessitent l'application des produits chimiques, des enzymes et des méthodes mécaniques (Aramvash *et al.*, 2015). L'utilisation des solvants a été introduite dans l'étape de la purification qui pourra avoir un effet négatif sur les êtres humains et l'environnement. Par conséquent, un traitement des eaux usées est primordial afin de réduire les fortes concentrations en polluants organiques et inorganiques (Fei *et al.*, 2016).

Comme mentionnés précédemment, les PHAs sont chers en partie à cause des coûts du processus de récupération et extraction. De ce fait, plusieurs études ont été menées afin de réduire les charges de production et extraction.

Le présent projet a comme objectif principal l'intégration d'un procédé de réutilisation de surnageants de bouillons fermentés au projet INRS-Bioplastique. Ce concept permet d'amortir les coûts du procédé et d'envisager une économie circulaire dans toutes les étapes du procédé de production de bioplastique.

1. REVUE DE LITTERATURE

1.1. Bioplastiques :

Au cours des dernières décennies, la production de matières en plastique en utilisant des intrants renouvelables, a suscité l'intérêt de la communauté scientifique (Dionisi *et al.*, 2005). Dans cette perspective, la production de polymères biodégradables présente une réelle alternative et à l'utilisation des ressources naturelles non renouvelables. De ce fait, deux objectifs peuvent être atteints simultanément : la réduction de l'utilisation des ressources non renouvelables et à l'atténuation de la pollution de l'environnement par les déchets de l'exploitation de ces dernières ressources (Koller, 2017).

Les matériaux bioplastiques sont produits à partir des ressources renouvelables, par voie biotechnologique ou chimique (Dietrich *et al.*, 2017). La nomenclature du biopolymère décrit principalement sa capacité d'être dégradée par les microorganismes (bactéries, champignons et microalgues) et leurs capacités à produire des enzymes qui peuvent décomposer le matériel (Volova *et al.*, 2011). Les variétés de bioplastiques, les plus connus sont l'acide poly lactique et les PHAs (Ebnesajjad, 2012).

L'acide polylactique (PLA), l'acide polyglycolique (PGA) et la polycaprolactone ont fait l'objet de nombreuses études particulièrement en ce qui a trait à leurs fonctions dans différentes applications dans des marchés distincts (Miller *et al.*, 1977). Les plastiques biodégradables présentent des avantages par rapport aux plastiques à base de pétrole dans différentes fonctions, relativement à l'acceptabilité des biopolymères dans l'environnement (Emadian *et al.*, 2017). De nombreux polymères biodégradables disponibles dans le commerce permettent de créer une large gamme de produits en plastique, chacun présentant les caractéristiques appropriées en fonction de sa mise en œuvre.

1.2. Polyhydroxyalcanoate (PHA) :

Grace à ses avantages discutés précédemment, l'intérêt des polymères biodégradables produits à partir des matières renouvelables a considérablement augmenté ces dernières années (Bugnicourt *et al.*, 2014). Les PHAs sont naturellement produits par une variété de microorganismes en tant qu'une source d'énergie ou d'apport en carbone (Jindal & Tiwari, 2013). Ils peuvent être transformés par la suite en produits utiles, dont leur biodégradabilité est bénéfique notamment lorsqu'on les utilise dans des emballages à usage unique et l'agriculture (Bugnicourt *et al.*, 2014).

1.3. Structure et biodégradabilité :

Le PHA a un poids moléculaire élevé, ce qui empêche les micro-organismes de le transporter à travers leurs membranes cellulaires (Steinbüchel *et al.*, 1992). Par conséquent, les microorganismes produisent des enzymes extracellulaires telles que les PHA dépolymérisés qui les transformeront en monomères ou oligomères solubles (figure 1) (Kasuya *et al.*, 1995).

Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) est homopolymère du 3-hydroxybutyrate qui fait partie de la famille du PHA. Le PHB est un polyester linéaire de l'acide D (-) -3-hydroxybutyrique, découvert par Lemoigne en 1925. Il est accumulé sous forme de granule intracellulaire par une grande variété de microorganismes à Gram positive et à Gram négatif dans des conditions de limitation en éléments nutritifs autre que le carbone (Dawes & Senior, 1973). Il existe plusieurs facteurs qui peuvent varier le poids moléculaire du PHB comme les conditions de croissance et les méthodes d'extraction (Koller, 2017).

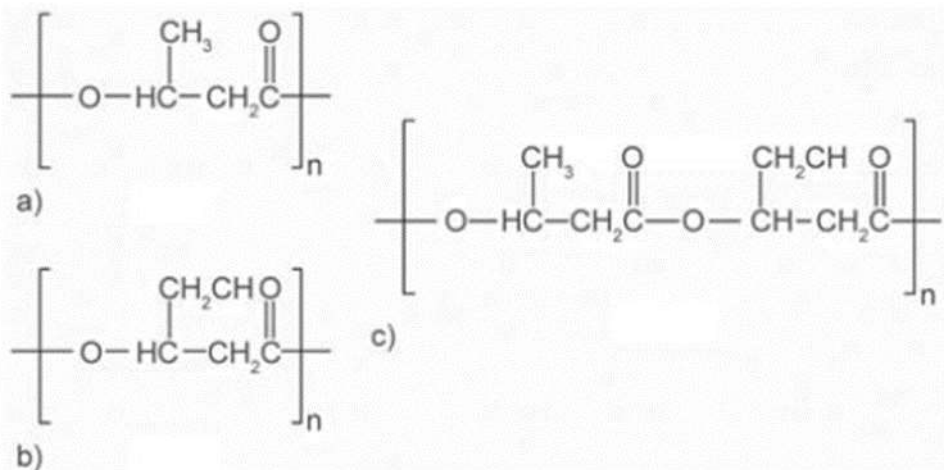


Figure 1: Structure du PHA

1.4. Microorganismes producteurs du PHA :

Les PHAs sont produits par nombreux microorganismes qui les accumulent comme un apport en énergie et/ou de carbone, dans des conditions d'insuffisance de certaines composantes tel que l'azote, le phosphore, le potassium, l'oxygène, le magnésium et le soufre et la présence d'un surabondance en source de carbone (Chen, 2009).

Les PHAs sont produits par des microorganismes qui sont issus d'une panoplie de substrats tel que des ressources renouvelables (amidon, cellulose, triglycérides, hémicellulose, blé et saccharose), des sous-produits (p. Ex., mélasse, lactosérum, glycérine, liqueur de maïs, son de riz), des acides organiques (p. Ex. Acide propionique, 4- L'acide hydroxy butyrique), les ressources fossiles (p. Ex., Le méthane, l'huile minérale, le lignite, le houille) et les déchets (Valentin *et al.*, 1999) (p. Ex., eaux usées, moulins à huile de palme et les effluents des boues activées) (Urtuvia *et al.*, 2014).

La composition du PHAs est relativement affectée selon la nature des microorganismes, la source de carbone utilisée et les conditions de la culture tel que montré au tableau 1.

Tableau 1: La production du PHA par différents microorganismes en utilisant une variété de source en carbone

Souche de production	Substrat de carbone	Type de PHA	PHA (%)	Référence
Pseudomonas strains	Biomasse d'herbe	Mcl-PHA	33	(Davis <i>et al.</i> , 2013)
Azotobacter beijerinickii	Poix de coco	PHB	48	(Sathesh Prabu & Murugesan, 2010)
Burkholderia sacchari	Hydrolysats de paille de blé	PHB	72	(Cesário <i>et al.</i> , 2014)
Recombinant E. coli	Bois de hêtre xylane et xylose	Copolymère	40,4	(Salamanca-Cardona <i>et al.</i> , 2014)
Burkholderia cepacia	Hydrolysats de bois	PHB	n.a.	(Pan <i>et al.</i> , 2012a)
Bacillus firmus	Hydrolysats de paille de riz	PHB	89	(Sindhu <i>et al.</i> , 2013)
Burkholderia cepacia	Hydrolysats de bois	Copolymère	40	(Pan <i>et al.</i> , 2012b)
Recombinant E. coli	Hydrolysats de cellulose + propionate	Copolymère	50	(Nduko <i>et al.</i> , 2012)
Bacillus megaterium	Grappe de fruits vide de palmier à huile	PHB	51,6	(Zhang <i>et al.</i> , 2013)
Burkholderia cepacia	Hydrolysats de bois	PHB	51,4	(Pan <i>et al.</i> , 2012b)
Haloferax mediterranei	Petit lait	PHB	53	(Pais <i>et al.</i> , 2016)
Haloferax mediterranei	Stillage d'éthanol à base de riz	PHBV	71	(Bhattacharyya <i>et al.</i> , 2014)

Ralstonia eutropha	Hydrolysats de jacinthe d'eau	PHB	58,3	(Radhika & Murugesan, 2012)
Burkholderia sacchari	Xylose	PHB	50	(Lopes <i>et al.</i> , 2011)
Sphingobium scionense	Bois résineux hydrolysé enzymatiquement	PHB	32	(Bowers <i>et al.</i> , 2014)
Burkholderia cepacia	Hydrolysats de marc de café usé	Copolymère	56	(Obruca <i>et al.</i> , 2014)
Bacillus thuringiensis	Hydrolysats de bagasse	PHB	39,6	(Gowda & Shivakumar, 2014)
Cupriavidus necator H16	Huile de friture usagée	PHB	32	(Verlinden <i>et al.</i> , 2011)
Burkholderia sacchari	Déchets de papier	PHB	44.2	(Al-Battashi <i>et al.</i> , 2019)
Cupriavidus necator DSM 7237	Glycérol brut	PHBV	78.9	(Kachrimanidou <i>et al.</i> , 2016)
Cupriavidus necator DSM545	Glycérol brut	PHA	62,7	(Mozumder <i>et al.</i> , 2014)
Pseudomonas sp. 61-3	Poudre d'eaux usées de soja hydrolysée	PHA	35	(Hokamura <i>et al.</i> , 2017)
Cupriavidus necator DSM545	Eaux usées de l'usine d'olive	PHA	55	(Martinez <i>et al.</i> , 2015)

1.5. Biosynthèse du PHA :

La biosynthèse du PHA implique un type différent d'enzymes se liant par une réaction complexe. Les souches bactériennes capables d'accumuler du PHA possèdent les gènes codants capables de la synthèse : la bêta-cétothiolase, l'acétoacétyl-CoA réductase et la polyhydroxyalcanoate synthase (PHAsynthase). La biosynthèse du PHB et du poly3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalérate (PHBV) commence par la condensation de deux molécules d'acétyloenzymes A avec l'acétoacétyl-CoA en présence de l'enzyme 3

kéthioliase (3-kéthioliase). Ceci est suivi par l'action de l'acétoacétyl-CoA réductase qui réduit l'acétoacétyl-CoA en R (-) – 3-hydroxybutyryl-CoA. La PHA synthase polymérise ensuite le R (-) 3-hydroxybutyryl-CoA pour former du PHB et / ou du R (-) – 3 hydroxyvalérylCoA pour obtenir le copolymère, noté PHBV ou P (3HB-co-3HV)(Steinbüchel, 2001).

1.6. Caractérisation du PHA :

Le PHA partage les mêmes propriétés physiques que le plastique conventionnel en ajoutant sa biodégradabilité (Choi & Lee, 1997). Le marché du PHA exprime la nécessité de combiner la biodégradabilité du polymère ainsi que sa résistance à l'humidité. Ces conditions seront primordiales pour l'application du PHA dans les emballages des liquides, emballages des produits alimentaires et les serviettes hygiéniques.

Les propriétés thermiques du PHA telles que la température de fusion (T_F), la température de transition vitreuse (T_V) et la température de la thermo dégradation (T_D) ont été bien définies pour une bonne application dans les différents domaines mentionnés précédemment. D'après l'étude de (El-Hadi *et al.*, 2002), la T_F est d'environ 175 °C et la T_G de 5 °C mesurées par la calorimétrie différentielle à balayage (DSC). Pour estimer la T_D , (Doi, 1990) ont chauffé l'échantillon dans des conditions bien contrôlées à un taux caractérisé tandis que la perte de masse est estimée. La T_D est d'environ -5.15 °C.

Les polymères du PHA sont de caractère non cristallin à excessivement cristallin compris entre 0% à 70% (Sudesh *et al.*, 2000). La cristallinité pourrait être estimée par une analyse structurale, y compris la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), la DSC et la diffraction des rayons X. Dans l'analyse du FTIR, le PHA présente des caractéristiques d'absorption à certaines longueurs d'ondes qui sont reliées directement avec la cristallinité. L'emplacement spécifique des bandes d'absorption est relativement relié à la composition chimique du polymère. En général, Les PHAs sont classifiés selon 2 groupes qui sont reliés principalement aux atomes de carbone que comporte chaque unité monomérique. Le PHA à courte chaîne (scl-PHA) comporte 3-5 atomes de carbone, tandis que le PHA à moyenne chaîne (mcl-PHA) comporte 6-14 atomes de carbone (Koning, 1995).

Cela est appliqué afin de caractériser les différents types du polymère tels que le PHA à chaîne moyenne (mcl-PHA), le PHA à courte chaîne (scl-PHA) et le PHA à moyenne et courte chaîne (scl-mcl-PHA) (Romano *et al.*, 2005). Les PHAs scl-PHA à chaîne courte sont constituées de 3 à 5 atomes de carbone tandis que les PHAs à chaîne moyenne (PHL) sont composés de 6 à 14 atomes de carbone (López *et al.*, 2015).

Tableau 2: Paramètres physiques des différents polymères

	PGA	PLA	P(3HB)	PCL	P(4HB)
T_m (°C)	225	175	180	57	60
T_g (°C)	35	65	1	-62	-51
Tensile Strength (MPa)	70	28-50	36	16	50
Tensile Modulus (MPa)	6900	1200-2700	2500	400	70

1.7. Accumulation du PHA :

Durant l'étape d'enrichissement, plusieurs facteurs opérationnels tels que le pH et la température peuvent influencer l'accumulation du PHA. Néanmoins, la stratégie de culture choisi fait partie des aspects les plus critiques lors des expériences d'accumulation de PHA. Une forte concentration en substrats en mode batch peuvent provoquer une inhibition qui en résulte une faible productivité du PHA. Pour résoudre cela, une panoplie de stratégies Fed-batch ont été proposées. La culture en discontinu-alimente pulse a été suggérée lorsque des mélanges synthétiques d'acides gras libres sont utilisés (Serafim *et al.*, 2008).

1.8. La production du PHA par des cultures bactériennes pures :

Les souches PHA à haute teneur accumulée en PHA peuvent être utilisées pour la production industrielle de PHA (Kleerebezem & van Loosdrecht, 2007). Pour la production industrielle, il est nécessaire d'utiliser des souches telles que *Alcaligenes*, *Azotobacter* *Staphylococcus*, *Pseudomonas oleifera* et de nombreuses souches recombinantes telles que *Aspergillus coli* et *Escherichia coli* (Grothe & Chisti, 2000). Dans les dernières décennies, les chercheurs se focalisent principalement sur la réduction des coûts de production du PHA (Du *et al.*, 2012). L'un des principaux facteurs à l'origine de son coût élevé est la pureté du substrat utilisé dans le processus de production, qui peut représenter 45% du coût total de production (Chee *et al.*, 2010). Si la matière première possède une forte teneur en carbone et en nutriments, une sélection sera mise en vigueur d'un producteur de PHA associé à la croissance, telle que *Alcaligenes latus* ou *Paracoccus denitrificans*. Par ailleurs, dans le cas où la matière première présente une insuffisance en nutriment essentiel pour la croissance tel que le phosphore, l'azote, etc..., une accumulation de PHA utilisant des bactéries non associées à la croissance serait idéale, à savoir *Cupriavidus Necator* (Koller, 2017). Les microorganismes producteurs de

PHA sont d'intérêts lorsqu'ils sont versatiles avec un rendement élevé aussi bien en milieu synthétiques qu'à partir de matières résiduelles municipales et agroindustrielles (Quillaguamán *et al.*, 2010). Il existe une variété de microorganismes pouvant saccharifier la cellulose et produire simultanément des PHAs (Pan *et al.*, 2012a). En plus, certains microorganismes isolés au sein des sites contaminés peuvent être considérés dans la production de PHA et la biorestauration de polluants toxiques et de plastiques post-consommation. Par ailleurs, les microorganismes isolés des environnements hypersalins sont considérés les plus performants, car ils associent chaque fois le benzène a un potentiel considérable de réduction des coûts de production de PHA, notamment en aval (Keenan *et al.*, 2004).

Au cours des dernières années, des outils de biologie de synthèse ont été constamment développés pour apporter des solutions aux problèmes industriels en maximisant la capacité cellulaire « l'espace de stockage » pour l'accumulation de PHA, en manipulant la composition de PHA pour concevoir des polymères destinés à des applications à haute valeur ajoutée et en améliorant l'efficacité des PHA.

Certaines matières premières renouvelables sont mises à l'étude afin de développer des procédés biotechnologiques pour la valorisation des résidus de déchets et ses sous-produits (Kucera *et al.*, 2017).

1.9. Effet des paramètres opérationnels sur la production de PHA

1.9.1. Le rapport C/N :

L'accumulation de PHA bactérien est largement affectée par les rapports carbone-azote (C / N). Le rapport C: N est un facteur très important pour la production de PHA. Ce paramètre doit être optimisé car il évolue avec la communauté microbienne ou le microbe utilisé. Au cours de la croissance d'*Alcaligenes latus* ATCC 29713 pour l'accumulation de PHA, il a été rapporté que l'accumulation la plus élevée se produit au rapport C: N de 28,3, ce qui a multiplié par 1,8 l'accumulation de PHA. L'accumulation de poly-3-hydroxybutyrate (P (3HB)) dans *Bacillus megaterium* était optimale (~ 70%) au rapport C / N initial de 15: 1 (rapport molaire) avec du saccharose comme source de C et du sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄) comme source d'azote (Faccin *et al.*, 2009). En outre, l'accumulation de PHA dans *Ralstonia eutropha* était maximale (~ 70%) au rapport C / N initial de 80: 1 avec de l'acide acétique, de l'acide propionique ou de l'acide butyrique comme source de C et du chlorure d'ammonium (NH₄Cl) comme source de N (Yang *et al.*, 2010). (Ahn *et al.*, 2015) ont étudié les effets du rapport carbone-azote (C / N) dans des hydrolysats de paille de riz simulés utilisant du glucose et du chlorure d'ammonium sur l'accumulation de polyhydroxyalcanoates (PHA) par *Cupriavidus necator*. La concentration de PHA a augmenté de 0,15 g / L à 0,72 g / L avec des rapports C

/ N croissants de 3,6: 1 à 360: 1; cependant, une augmentation supplémentaire du rapport C / N (c.-à-d. condition sans N) a entraîné une concentration de PHA plus faible, les degrés plus élevés de condition déficiente en N (par exemple, rapport C / N de 360: 1) peuvent être préférés à la Condition sans N pour l'accumulation de PHA.

1.10. Récupération du PHA :

Le développement de nouvelles méthodes de récupération des PHA est l'un des principaux éléments clé pour la faisabilité d'une bioraffinerie de production de PHA utilisant la fermentation d'une matrice pure. La récupération du PHA nécessite une combinaison de différentes techniques. La purification de PHA nécessite généralement cinq étapes : la récolte de la biomasse, le prétraitement, la récupération de PHA, l'accumulation de PHA, et le polissage et le séchage (Madkour *et al.*, 2013). La récolte de biomasse est la concentration de biomasse à l'aide de techniques telles que la filtration ou la centrifugation. Les PHA étant des polymères intracellulaires, il est nécessaire de concentrer la biomasse avant la récupération du PHA. L'objectif principal du prétraitement est de récupérer les particules dans la biomasse microbienne, techniques de séchage incluses (lyophilisation et séchage thermique), broyage, prétraitements chimiques et biochimiques, etc., L'étape de prétraitement peut combiner plusieurs méthodes. La phase de récupération comporte principalement deux méthodes : la solubilisation de PHA et la perturbation de la masse cellulaire non-PHA (NPCM). Dans certains cas, l'enlèvement du NPCM précède l'étape de la solubilisation du PHA. L'étape de l'accumulation de PHA dépend directement de la technique de récupération utilisée. Durant la solubilisation du PHA, le PHA se concentre en utilisant la précipitation d'alcools. Par ailleurs, dans le cas de la perturbation par les NPCM, la récupération est effectuée en collectant les granules de PHA. Au cours des étapes finales, les PHA récupérés peuvent être polis en éliminant les résidus des étapes précédentes, ou peuvent être séchés (Koller *et al.*, 2013).

1.11. Pré-traitements :

Lors des prétraitements, on a recours aux méthodes chimiques, physiques et biologiques pour faciliter la récupération du PHA. Ces techniques se focalisent principalement sur l'affaiblissement de la structure bactérienne qui protège et entoure les granules du PHA. Après la récolte de la biomasse, le séchage est parmi les méthodes traditionnelles du pré-traitement utilisées, qui implique le séchage par la chaleur et la lyophilisation. Ces derniers font partie des méthodes les plus utilisées dans la récupération du PHA. La technique de séchage par chaleur permet l'élimination d'une majeure partie des molécules d'eau dans la biomasse facilitant l'extraction postérieure du PHA. La lyophilisation présente des avantages intéressants, sauf que la technique ne peut pas être appliquée dans un cadre industrielle dû à

des difficultés économiques et technique. En raison des difficultés industrielles ont accru l'intérêt pour la récupération du PHA à partir d'une biomasse humide (Aramvash *et al.*, 2016). La lyophilisation peut être un traitement unique ou peut précéder un autre type de traitement. La lyophilisation précède les pré-traitements thermiques, chimiques et mécaniques. Toutes ces techniques comprennent une autre technique de récupération utilisant des solvants (Yang *et al.*, 2015). Selon (Samorì *et al.*, 2015), le pré-traitement chimique par du NaClO s'avère le meilleur pré-traitement comparativement aux traitements thermiques et mécaniques. Toutefois, ce pré-traitement cause une réduction importante du poids moléculaire du polymère.

Les pré-traitements sans lyophilisation consistent en des méthodes chimiques et physiques, avec des méthodes comprenant du chlorure de sodium (NaCl) et de l'hypochlorite de sodium (NaClO). (Anis *et al.*, 2013) ont utilisé le NaCl dans un pré-traitement pour la digestion du NaClO. La phase du pré-traitement supplémentaire a généré une augmentation dans le rendement et la pureté. Le pré-traitement par le NaCl a modifié les conditions osmotiques dans le milieu qui entraîne une déshydratation et le rétrécissement des cellules. Cela déstabilise les cellules facilitant la libération des granules du PHA. Les méthodes physiques comprennent des méthodes à haute température et par ultrasons. (Neves & Müller, 2012) ont évalué trois températures (121, 100 et 80 °C) durant 15 min comme étant des conditions pour le pré-traitement. Le traitement thermique à 121 °C a donné le meilleur résultat par rapport aux traitements avec 100 et 80 °C. Le traitement thermique améliore l'élimination du PHA en dénaturant les protéines, d'ADN et d'ARN, en déstabilisant la paroi cellulaire microbienne et en inactivant la dépolymérase du PHB (Neves & Müller, 2012). La méthode par ultrasons consiste principalement en émission des ondes sonores afin de créer des perturbations dans la paroi cellulaire et percer le matériel cytosolique dans le milieu aqueux. (Leong *et al.*, 2017) ont utilisé la méthode par ultrasons avant l'exécution d'une séparation à deux phases. Parmi ces avantages, l'absence de techniques de récoltes ainsi que la rapidité de l'exécution.

Les méthodes de pré-traitement peuvent augmenter la récupération et la pureté du PHA extrait à partir du bouillon du fermenteur. Sauf que leur intégration à l'échelle industrielle a besoin d'une analyse technique et économique. De plus, l'existence d'une panoplie de méthodes de pré-traitement qui peuvent être employées, ne présente aucune compatibilité pour un usage à l'échelle industrielle. Les pré-traitements, répondent aux besoins de l'industrie de production du PHA, nécessitent une utilisation d'une biomasse humide et non récoltée afin de réduire les étapes de purification et les coûts reliés aux processus. Le choix de la méthode convenable du Pré-traitement dépend directement de la souche bactérienne, des caractéristiques chimiques du bouillon du fermenteur ainsi que l'application envisagée du PHA. Par

conséquent, chaque processus de production du PHA doit être étudié du point de vue environnemental, technique et économique.

1.12. Les techniques de récupération :

Récemment, on constate une utilisation intensive de la perturbation du NPCM comme un atout de récupération du PHA incorporés dans la biomasse bactérienne. L'intégration d'une telle technique est due principalement à la protection de l'environnement qu'elle offre comparativement aux autres techniques traditionnelles qui utilisent des solvants halogénés. De plus, certaines techniques d'extraction du PHA par la perturbation du NPCM ont utilisé une biomasse humide ou de la biomasse non récoltée. Par conséquent, cette technique va assurer une réduction d'étapes et des coûts de purification.

1.12.1. La perturbation chimique :

La perturbation chimique du NPCM emploie des techniques qui consistent en l'utilisation de certains composés chimiques pour perturber la paroi bactérienne et dénaturer le matériel cytosolique. Ils existent trois principales méthodes chimiques, soient l'utilisation Hypochlorite de sodium (NaClO), sodium dodecyl sulfate (SDS) et l'hydroxyde de sodium (NaOH). Le traitement par NaOH déstabilise la paroi bactérienne en réagissant avec la couche lipidique dans le cadre d'une réaction de saponification. Cela augmente la perméabilité de la membrane cellulaire (Anis *et al.*, 2013). Le traitement par NaOH a obtenu un taux de récupération élevée en utilisant une biomasse prétraitée ou non-traitée (Anis *et al.*, 2013). En prétraitant la biomasse, cela a facilité la procédure pour NaOH afin d'améliorer la pureté et le rendement. En combinant un prétraitement par NaCl la digestion par NaOH a développé la pureté et la récupération d'environ 10% (Anis *et al.*, 2013). López-Abelairasetal et al. 2015 ont remarqué une réduction lors l'extraction en traitant une concentration élevée du NaOH et de la biomasse (López *et al.*, 2015). Une concentration supérieure à 2,5% de la biomasse a causé une réduction dans la récupération et la pureté. Les concentrations de NaOH supérieures à 0.5 N ont affecté la récupération sauf que la pureté est constante par rapport aux concentrations élevées. Vilano et al. ont atteint une récupération entre 80-87% en utilisant une concentration élevée en NaOH (1 M) ainsi par rapport à la concentration de la biomasse (6 :1 biomasse : solution chimique) avec des temps d'extraction prolongée (6-24h). En appliquant ces conditions, la pureté atteinte était au-dessous de 60% (Villano *et al.*, 2014).

Récemment, l'hypochlorite de sodium (NaClO) a démontré certains caractères positifs par rapport aux traitements du NPCM (Koller *et al.*, 2013). Par conséquent, plusieurs recherches ont été effectués afin de développer cette technique et de l'évoluer (Villano *et al.*, 2014). Un processus séquentiel continu pour la production du PHA a été proposé. Durant cette

recherche, villano et al. Ont obtenu une récupération élevée en polymère (100%) et une pureté (98%). Ce processus consiste en trois étapes principales : une étape de production en utilisant une culture mixte, Une étape d'accumulation du PHA et une étape d'extraction du PHA en utilisant NaClO (5%) avec une perturbation d'une durée de 24h. cet approche a pu produire 1.43 g PHA/L.d et ça était stable durant les 4 mois (Villano *et al.*, 2014).

La perturbation biologique emploi des agents biologiques ou des organismes pour objectif de libérer du PHA à partir des cellules bactériennes. Les bactériophages ont été inclus dans le process tout en exposant les bactéries productrices du PHA vu leur capacité à utiliser le cycle lytique pour libérer les granules du PHA. Quand le cycle lytique s'achève, le virus s'échappe de la cellule hôte en brisant la paroi bactérienne. Récemment, les méthodes de la perturbation biologique incluent des bactéries prédatrices, des rats et des vers de farine (Murugan *et al.*, 2016). Martinez et al., a proposé l'utilisation obligatoire des bactéries prédatrices *Bdellovibrio bacteriovorus* comme étant un agent lytique prometteur pour récupérer les bioproduits intracellulaires comme le PHA. *B. bacteriovorus* a atteint une récupération du PHA de 60 %. Le pourcentage de la récupération obtenu a été directement attribuée à l'activité de la dépolymérase PhaZ qui hydrolyse le PHA durant le cycle de vie du *B. bacteriovorus* (Martinez *et al.*, 2015). La récupération biologique en utilisant *B. bacteriovorus* possède certainement des avantages qui pourraient être bénéfique pour l'industrie de production du PHA par exemple d'éviter la récolte cellulaire et les pré-traitements. Cette technique présente ainsi des inconvénients comme l'utilisation des solvants organiques, le temps du traitement et la faible récupération. Avec le temps, la méthode biologique pourra être incluse avec d'autres types de traitements pour éviter l'usage des solvants afin d'augmenter la récupération du PHA.

Récemment, des chercheurs ont utilisé les systèmes digestifs de certains organismes comme une technique de perturbation du NPCM. Durant ces traitements, une variété d'organismes a été nourrie avec des bactéries riches en PHA. Ensuite, les granules de PHA ont été récupérés des excréments de ces organismes. Durant ce processus, ces organismes ont digéré les NPCM sans réduire le poids moléculaire du PHA. Kunasundari et al., ont nourri des rats Sprague des cellules lyophilisées de *Cupriavidus Necator* dans un régime protéique unicellulaire pendant plusieurs jours (Kunasundari *et al.*, 2013). Les boulettes fécales étaient blanchâtres ainsi que riche en PHA (82-97%). Les chercheurs ont démontré ainsi la tolérance et l'invulnérabilité des rats de Sprague Dawley aux régimes des cellules *Cupriavidus Necator*. Kunasundari et al., ont étudié également la purification des excréments blanchâtres des rats Sprague Dawley avec de l'eau et les surfactants (Kunasundari *et al.*, 2017). L'utilisation du SDS 2% comme une étape de purification a augmenté la pureté du PHA biologiquement extrait. Le pourcentage de la récupération a été semblable avec l'extraction par des solvants.

La perturbation biologique des NPCM est une alternative potentielle des autres techniques. Ce processus ne nécessite pas des instruments coûteux et des solvants.

1.13. L'extraction du PHA :

Le PHA microbien est conservé comme étant des granules insolubles dans le milieu intracellulaire des microorganismes. Les méthodes pour récupérer le PHA consiste principalement en la dégradation de la membrane bactérienne, la solubilisation et la purification du PHA. Les méthodes conventionnelles de la récupération du PHA dans la biomasse microbienne utilisent des méthodes d'extraction par solvants, des méthodes chimiques et enzymatiques. La méthode d'extraction par solvants est parmi les méthodes les plus répandues. Cela est expliqué par la pureté du polymère extrait. Durant une étude par Ramsay et al. 1990, différents types de solvants ont été testés pour déterminer leurs efficacités ainsi que la pureté du polymère extrait. Ces solvants sont le chloroforme, chlorures de méthylène et 1,2 dichloroéthane sous différents conditions (Chloroforme :61 °C, 1 h ; chlorure de méthylène : 40 °C, 24 h ; 1,2 dichloroéthane : 83 °C, 0.5 h). Après l'extraction par solvants, Les débris cellulaires seront éliminés par suite via la filtration. La solution sera concentrée par évaporation rotative avant que le polymère P3HB ne soit précipité par addition goutte à goutte d'éthanol glacé. Le chloroforme et le 1,2- dichloroéthane ont eu un taux élevé en récupération du PHA (68%) avec une pureté élevée (96% jusqu'au 98%) comparant au chlorure de méthylène (récupération :25%, pureté : 98%).

1.14. Recyclage du surnageant du bouillon fermenté :

Le traitement du surnageant du bouillon fermenté flux de rejets du PHA est un grand problème pour l'industrie du PHA. Ces derniers contiennent une forte teneur en DCO, DBO et métaux. Afin de résoudre ce problème, Il est important de réduire les rejets ainsi les coûts de production du PHA. Des efforts considérables ont été fournis afin de tester des substrats pas chers, comme la biomasse lignocellulosique, les rejets industriels et le glycérol brut. Le PHA est un produit intracellulaire, cela implique une co-production significative de la masse cellulaire dépensée, contenant des polysaccharides, des protéines, des nutriments and les éléments traces. De plus, Ils existent une concentration importante de nutriments résiduels et des éléments traces dans les flux de rejets. Par conséquent, il est primordial de développer des

processus pour une utilisation efficace de la masse cellulaire dépensée et les eaux usées pour un développement de l'industrie du PHA. Les flux de rejets disponibles pour la production du PHA contiennent des niveaux variés de nutriments (N et P). Afin d'assurer une accumulation de PHA, l'intrant doit posséder un minimum de concentration de nutriments sinon cela peut inhiber l'accumulation. Ces flux de rejets ont été testés afin de vérifier leur capacité à être recyclé. D'après l'étude que notre groupe de recherche a effectuée, il est possible que ce résidu soit recyclé comme un substitut d'une importante portion de l'eau fraîche dans les futures fermentations. Après l'addition d'une source d'azote et de phosphate pour une meilleure cultivation des microorganismes. Par conséquent, l'étude va contribuer directement aux succès économiques de ces biomatériaux prometteurs.

1.15. PROBLEMATIQUE DE RECHERCHE

En se basant sur la revue de littérature, le problème majeur de la production du PHA est son coût élevé de la production avec une grande partie associée à la source de carbone et les nutriments utilisés pour la production du PHA. Par conséquent, ces problèmes vont être présentés ci-dessous :

- Une forte teneur en nutriments résiduels présents dans le bouillon de fermenteur après la fermentation en raison des besoins élevés en nutriments pendant le processus de production de PHA.
- La présence de ces nutriments résiduels dans le bouillon fermenté augmente le coût de traitement nécessaire pour traiter les eaux usées générées après l'extraction de PHA. Cela contribue à augmenter la charge polluante de l'environnement.
- La consommation intensive en matière d'eau, surtout à l'échelle industrielle, ne respecte pas le concept du développement durable.

1.17. OBJECTIFS ET ORIGINALITE DE LA RECHERCHE

1.17.1. Objectifs :

L'objectif principal de cette étude de recherche consiste à démontrer la faisabilité du recyclage du surnageant du bouillon fermenté issu de la production du PHA par *Cupriavidus necator*.

Les objectifs spécifiques sont comme suit :

- Une analyse chimique des différents paramètres de surnageant du bouillon fermenté ;
- Recyclage du surnageant du bouillon fermenté pour la production du PHA en fonction du ratio Eau/ Surnageant (V/V) ;
- Étude de fermentation dans un fermenteur à 5L et 7L de capacité à partir des résultats du flacon d'agitation.

1.18.2. Originalité :

Cette recherche permettra pour la première fois d'utiliser les surnageants générés durant la production du PHA comme une source nutritive et un apport en carbone supplémentaire. D'autres part, la substitution d'une portion importante de l'eau fraîche par le surnageant issu du bouillon fermenté est une nouveauté dans le processus de production de PHA.

2. MATERIEL ET METHODE

2.1. Collecte des échantillons et prétraitement

Le bouillon fermenté généré lors des essais antérieurs de fermentation menés par un membre de notre équipe de recherche a servi à la présente étude. Le bouillon fermenté a été recueilli dans des chaudières, puis conservé dans la chambre froide à 4°C afin d'éviter la dégradation du milieu.

Le tableau 3 présente les conditions d'opération de l'étude antérieure ainsi que les pourcentages de production de PHA.

Tableau 3: Étude antérieure de la production du PHA sous différentes conditions

Échantillons	1	2	3
Milieu de culture	Glycérol purifié du Bioliq (30 g/L) + Boue (15 g/L)	Glycerol purifié du bioliq (30 g/L)	Huile de cuisson usée enrichie en acide acétique (8 gC/L) + boue (15 g/L)
Matière en suspension (g/L)	29	20	54
PHA (%)	47	50	83

2.2. Prétraitements des échantillons

2.2.1. *Traitement thermique :*

Après la collecte du bouillon issu du fermenteur, il est primordial de passer par un pré-traitement thermique. Ce traitement thermique permet l'éclatement des cellules afin d'obtenir le produit intra-cellulaire (PHA). Ce traitement a été réalisé dans un autoclave à 121 °C pendant 15 min.



Figure 2: Autoclave

2.2.2. Séparation solide-liquide :

Une étape primordiale pour assurer la concentration des PHA et toutes sortes de produits intra-cellulaires (lipides microbiens, protéines, etc.) dans le culot. Le résidu obtenu après le traitement thermique est centrifugé à 8000 RPM pendant 10 min. Le culot obtenu dans les tubes à centrifugation a été jeté tandis que le surnageant a été collecté dans des bouteilles pour des futures expériences.



Figure 3: La centrifugeuse du laboratoire

2.3. La caractérisation du surnageant

Une caractérisation chimique du surnageant est une étape fondamentale afin d'établir un bilan complet des différents paramètres pertinents à l'étude. Les analyses effectuées sur le surnageant concernent : DCO, les PHA, quantification des huiles, métaux, carbone et azote totale. Ces derniers paramètres sont des indices très importants pour des études ultérieures.

Afin d'atteindre mon objectif, j'ai planifié une série d'analyse pour caractériser chimiquement le surnageant du bouillon du fermenteur.

2.3.1. Demande chimique en oxygène (DCO) :

Afin de déterminer la demande chimique en oxygène, un échantillon est d'abord prélevé puis acidifié à 0.2 % afin d'être conservé dans la chambre froide à une température de 4 °C. Un spectromètre UV 0811 M136 (Marque Varian) a été utilisé pour diverses mesures de DCO. La méthode standard de mesure de la DCO obtenue sous la direction du centre d'expertise en analyse environnementale de Québec.

2.3.2. pH

La mesure du pH a été réalisée à l'aide d'un pH-mètre de type Fisher Scientific Accumet (modèle XL25). L'étalonnage de ce dernier a été effectué avec des solutions tampon pH=4 et pH=10.

2.3.3. Quantification des huiles

L'analyse suivante, nous permet de quantifier les différentes composantes des huiles. Après, une quantification pertinente relative aux taux de carbone dans ces derniers. La prise du 2 mL de l'échantillon tout en ajoutant 5 mL de l'hexane acidifiée avec l'acide benzoïque (100 mL d'hexane et 0.3 g de l'acide benzoïque). Un mélange de la solution pour homogénéiser les 2 matrices. Un séchage au bain marie à 60 °C pendant 15 min. Ensuite, un autre mélange sera effectué puis laisser la solution à température ambiante ainsi pour assurer la création des phases pendant 15-30 min. La phase supérieure est récupérée à l'aide de pipettes Pasteur puis transférer dans des flacons-GC.

2.3.4. Carbone total

La mesure du carbone total est un moyen qui nous permet de quantifier la concentration en carbone total (organique et inorganique) dans un échantillon. L'étude a été faite à l'aide de l'appareil Shimadzu TOC-VCPH. Les analyses ont été effectuées dans le laboratoire de l'INRS.

2.3.5. Métaux

L'analyse chimique des métaux a été effectuée par spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif à l'aide d'un instrument de marque Varian (modèle Vista AX, Australie). Les échantillons ont été acidifiés avec une concentration de 1% d'acide nitrique. Les analyses ont été effectuées dans le laboratoire de l'INRS.

2.3.6. Estimation des protéines

Afin de quantifier le taux des protéines dans l'échantillon, nous avons appliqué la méthode de dosage des protéines de Bradford.

2.3.6.1. *Le réactif Bradford*

Dissoudre 50 mg de bleu de Coomassie brillant G-250 dans 50 mL de méthanol et ajouter 100 mL d'acide phosphorique à 85 % (p/v) (H_3PO_4). Ajouter lentement le mélange de solution acide dans 850 mL de l'eau et laisser le colorant se dissoudre complètement. Filtrer avec du papier Whatman #1 pour éliminer les précipités juste avant utilisation. Il faut conserver la solution dans une bouteille sombre à 4 C.

2.3.6.2. *Procédure de test standard :*

Préparer cinq à huit dilutions d'un standard de protéine (habituellement BSA) avec une gamme de 5 à 100 ug de protéines. Diluer des échantillons de protéines inconnues pour obtenir 5 à

100 µg de protéines / 30 µL. Ajouter une solution étalon ou d'échantillon de protéine inconnue dans une tube à essai correctement étiqueté. Ajouter 1.5 mL de réactif Bradford à chaque tube et bien mélanger. Incuber à température ambiante pendant au moins 5 min. L'absorbance augmentera avec le temps. Mesurer l'absorbance à 595 nm.

2.3.6.3. Procédure de micro-essai :

Préparer cinq solutions étalons (1 mL chacune) contenant 0, 10, 20, 30, 40 et 50 µg mL⁻¹ BSA. Pipeter 800 µL de chaque solution étalon et échantillon dans un tube à essai propre et sec. Les solutions de protéines sont normalement dosées en double ou en triple. Ajouter 200 µL de concentré de réactif colorant dans chaque tube et mélanger. Suivez la procédure décrite ci-dessus pour la procédure de test standard.

2.4. Étude en Erlenmeyer pour recycler le surnageant pour la production du PHA

La composition de la préculture 2 et du milieu de production est la même. Cependant, la concentration des boues doit être de 15 g / L (ou la concentration requise par exemple 20, 25 ou 30 g / L) dans le milieu de production final et le Ca(OH)₂ doit être ajouté et stérilisé de la même manière que celle discutée pour la préculture. 2. La concentration initiale de carbone (optimisée pour différents substrats) à utiliser pourrait être plus élevée pour le milieu de production final par rapport à la préculture-2. Pour la préparation des milieux minéraux, la stérilisation, le mélange, le maintien du pH et l'examen de la culture avant la culture-2, des étapes similaires doivent être suivies comme décrit pour la préculture 2. Après l'inoculation, les flacons doivent être incubés dans un agitateur rotatif à 200 tours par minute (tr / min) à 30 °C pendant 96 h. L'échantillonnage doit être effectué toutes les 12 heures pour la mesure des UFC, de la consommation de carbone, de la biomasse et de la PHA.

2.4.1. La culture microbienne

Cupriavidus necator 11599 doit être utilisé dans cette étude. Il doit être sous-cultivé et strié sur des plaques de gélose en milieu minéral (MMA). Le milieu minéral (milieu de base minéral palleroni et doudoroff modifié) se compose de (g / L): 6,00 Na₂HPO₄.12H₂O, 2,4 KH₂PO₄, 1,00 NH₄Cl, 0,50 MgSO₄ · 7H₂O, 0,01 FeCl₃.6H₂O, 0,01 CaCl₂.6H₂O, 20 Agar. Un glucose de 20 g / L doit être ajouté au milieu minéral. La gélose doit être stérilisée au glucose. La solution de FeCl₃.6H₂O et CaCl₂.6H₂O doit être stérilisée sur filtre à travers un filtre en polyéthersulfone (PES) de 0,2 µm. Ces deux composantes doivent être utilisées lors de la préparation des plaques et de la préculture 1 (milieu synthétique). Sinon, pour la préculture 2 et les milieux de production (avec boues), pas besoin d'ajouter ces composantes. Na₂HPO₄. 12H₂O, KH₂PO₄, NH₄Cl doivent être autoclavés ensemble et MgSO₄.7H₂O doit être autoclavé séparément à 121 °C pendant 15 min. et ces solutions doivent être mélangées aseptiquement après refroidissement. Le pH moyen doit être maintenu à 6,8. Avant de sortir de la plaque

précédemment stockée, la petite boucle de culture (de la plaque précédemment stockée) doit être placée sur une lame microscopique et ajouter une goutte de solution saline stérilisée à 0,85%. Dispersez la culture sur la lame et après avoir appliqué la lamelle, examinez soigneusement au microscope. Les plaques doivent être incubées à 30 ± 1 °C pendant 3 jours puis conservées à 4 °C pour une étude plus approfondie. La culture doit être relancée tous les 15 jours et le stock de glycérol (protocole ci-dessous) doit être préparé tous les 6 mois après une analyse minutieuse des caractéristiques de la culture.

2.4.2. Préculture 1

Une boucle de *Cupriavidus necator* provenant de plaques (MMA) était inoculée dans un flacon Erlenmeyer contenant du milieu stérilisé (environ 20-30 ml). Le milieu de pré-culture-1 était : (g / L) : 6,00 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2,4 KH_2PO_4 , 1,00 NH_4Cl , 0,50 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,01 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. La solution de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ était stérilisée sur filtre au travers un filtre en polyéthersulfone de 0,2 μm (PES). Un glucose de 10 g / L doit être complété par le milieu minéral et a été stérilisé séparément. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NH_4Cl doivent être autoclavés ensemble et $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a été autoclavé séparément à 121°C pendant 15 min. et ces solutions ont été mélangées aseptiquement après refroidissement. Le pH moyen a été maintenu à 6,8. Les flacons ont été incubés dans un agitateur rotatif à 200 tours par minute (tr / min) à 30 °C pendant 24 h.

2.4.3. Préculture 2

Les cellules en croissance active issues de la pré-culture-1 (5% v / v, ont été confirmées) ont été utilisées comme inoculum pour la pré-culture-2. Les boues de pâtes et de papiers lavées (10 g / L) ont été utilisées comme substrat et de l'hydroxyde de calcium (0,11 g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ / g de boues) a été ajouté dans les boues avant la stérilisation. La composition du milieu minéral est la même que celle de la préculture 1. La même source de carbone qui a été utilisée pour le milieu de production final a été utilisée pour la pré-culture-2 (glycérol brut ou huile acidifiée ou tout autre substrat (10 g c / L). La combinaison de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NH_4Cl a été autoclavée ensemble à 121 ° C pendant 15 min. Les boues traitées au $\text{Ca}(\text{OH})_2$ avec addition de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ont été stérilisées à 121 ° C pendant 30 min. après refroidissement. L'huile acidifiée ne nécessite pas de stérilisation et peut être utilisée directement. Après refroidissement, les minéraux et la source de carbone ont été ajoutés dans le ballon contenant les boues dans des conditions aseptiques. Le pH moyen a été maintenu (6,8) avec un pH-mètre maintenu dans flux d'air laminaire. Avant l'inoculation, la préculture 1 a été examinée attentivement au microscope pour éviter toute contamination lors de la préculture 2. Après l'inoculation, les flacons ont été incubés dans un agitateur rotatif à 200 tours par minute (tr / min) à 30 °C pendant 24 h.

2.5. Plan expérimentale de l'étude erlenmeyer

Pour étudier l'effet du substrat sur le processus de production de PHA, cinq substrats ont été testés. De l'huile de cuisson usée acidifiée a été utilisée comme seule source de carbone pour la production de PHA en utilisant le surnageant du bouillon fermenté. Toutes les expériences ont été menées dans des fioles Erlenmeyer de 1 litre avec un volume de travail de 300 mL. Les flacons ont été incubés dans un incubateur rotatif à 30 °C, La vitesse d'agitation a été maintenue à 200 tr/min et la fermentation a été effectuée pendant 96h. Dans chaque fiole, 0,3 g de NH₄Cl a été ajouté comme source d'azote. Les détails de l'expérience sont répertoriés dans le tableau 6.

2.6. Étude fermenteur pour recycler le surnageant de la production du PHA

2.6.1. Préparation des médias :

Préparez l'hydroxyde de sodium 4N, l'acide sulfurique 4N et l'antimousse. Préparez les bouteilles d'acide, de base et antimousse, y compris les tubes, et connectez les bouteilles au fermenteur.

Pour une fermentation discontinue alimentée, une source de carbone doit être ajoutée en fonction de la consommation et une concentration optimisée de minéraux doit être ajoutée toutes les 12 heures. Le fermenteur doit être surveillé en continu et toutes les 3 heures, les valeurs des données du fermenteur telles que l'OD, l'agitation, le débit d'air, le pH ont été saisies sur la fiche technique.

Toutes les 6 h, les solides en suspension, les UFC, les PHA et la consommation de carbone ont été déterminés.

Une fois la fermentation terminée, tout le bouillon de fermentation était collecté et stocké dans une chambre froide pour une analyse plus approfondie. Tous les tubes doivent être retirés avec soin et les tubes et fermenteurs ont été nettoyés soigneusement.

2.7. Méthode analytique

2.7.1. Analyse UFC :

Les tubes salins ont été préparés en ajoutant 4,5 ml de solution saline (0,85% p / v) dans différents tubes et une stérilisation a été effectuée. Les pointes (100 µL et 1 ml) ont également été stérilisées. L'UFC a été mesurées pour différents échantillons prélevés à différents intervalles de temps (toutes les 6 heures à partir du fermenteur et 12 heures à partir des études sur flacons à agitation). Pour le comptage des UFC, 0,5 ml de l'échantillon mélangé à l'aide d'un vortex a été prélevé et ajouté dans le premier tube de UFC, puis après mélange, 0,5 ml de l'échantillon a été transféré dans le 2^e tube de UFC, puis ainsi de suite jusqu'à 10⁴ à 10¹³ dilutions (les dilutions ont été fait en fonction de 0h à 96h d'échantillons fermentés). Ensuite, 100 µL d'échantillons provenant des 2 ou 3 derniers tubes UFC ont été étalés sur des plaques

de gélose nutritive et l'incubation doit durer 48 heures à 30 °C. Les colonies ont été comptées manuellement en double et la moyenne a été indiquée en nombre pour les colonies formant l'unité par ml.

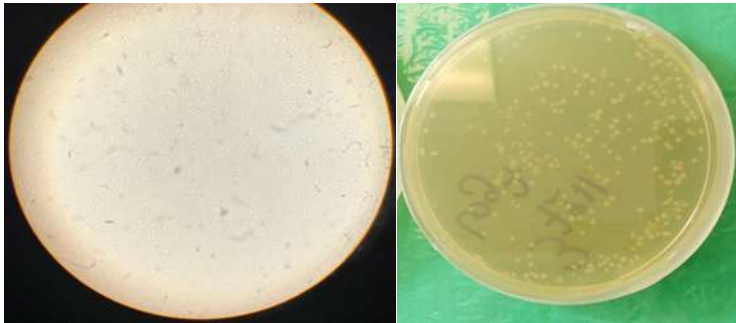


Figure 4: Bouillon fermenté après 72h de fermentation sans contamination microbienne et vue microscopique

2.7.2. Matière en suspension :

La concentration de biomasse ou les matières en suspension (MES) ont été mesurées selon les méthodes standards. Les échantillons ont été centrifugés à 8000 tr / min pendant 10 min et jetés le surnageant soigneusement, puis le culot a été lavées avec de l'eau pour éliminer toute autre impureté (savon ou glycérol). Le culot lavé a été transféré dans une tasse en aluminium pré-pesée (W_1) et séchée au four (température 60-70°C) jusqu'à son poids constant (W_2). La concentration de solides (g / L) en utilisant l'équation : $W_2 - W_1 / 0,010$ (En supposant échantillon de 10 mL pour l'analyse).

2.7.3. La quantification du PHA

Les échantillons pour l'analyse des PHA par chromatographie en phase gazeuse (GC) doivent être préparés à partir de la biomasse séchée. 20 à 50 mg de biomasse séchée doivent être traités avec 2 ml de méthanol acidifié (3% v / v de 36 N H_2SO_4 et 0,3% p / v d'acide benzoïque) et 1 ml de chloroforme pur dans 10 ml de tube à essai en Pyrex avec Casquette doublée de téflon. Par la suite, les échantillons ou étalons (2,5 mg à 16 mg) doivent être chauffés à 90 °C pendant 3,5 h dans un bain d'huile. Après chauffage, les échantillons doivent être refroidis à température ambiante. Ajouter ensuite 1 ml de chloroforme et 1 ml d'eau dans les tubes de réaction, mélanger pendant 1 min et doit être maintenu à 30 min pour la séparation des phases. Trois phases doivent être formées ; la phase inférieure contient du PHA soluble dans le chloroforme ; la couche intermédiaire contient des débris cellulaires et la phase supérieure contient du méthanol et de l'eau. Un mL de phase chloroforme doit être prélevé avec précaution à l'aide d'une pipette Pasteur sans perturber la couche supérieure et la couche intermédiaire pour l'analyse GC. La composition copolymère doit être mesurée avec du GC (modèle Varian 3800) équipé d'une colonne capillaire Zebron ZB-5 et d'un détecteur à ionisation de flamme Shimadzu C-R5A Chromatopac et l'acide benzoïque fera office d'étalon

interne. Le poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (3HB-co-3HV) (teneur en PHV 12% en poids, Aldrich Chemical Company, Inc.) doit être utilisé comme standard pour la quantification du PHA dans les échantillons.

2.8. La préparation des fermenteurs :

2.8.1. Étalonnage :

La sonde d'oxygène dissous et la sonde de pH doivent être connectées au fermenteur avant 2h d'étalonnage. La sonde OD doit être calibrée pour «0 » et «100 ». La sonde de pH doit être étalonnée à l'aide de tampons pH 4 et 7.

2.8.2. Préparation des médias :

Ajouter des boues concentrées (15 ou 20 ou 25 g / L) au fermenteur, puis ajouter de l'hydroxyde de calcium (0,11 g / g de solides) dans les boues. Préparez l'hydroxyde de sodium 4N, l'acide sulfurique 4N et l'antimousse. Préparez les bouteilles d'acide, de base et anti-mousse, y compris les tubes, et connectez les bouteilles au fermenteur.

2.8.3. Précautions avant la stérilisation :

Tout d'abord, il est important d'enveloppez le câble de la sonde de température et tous les filtres avec du papier aluminium et coton. Ensuite, il est nécessaire de clipsez fermement le tube d'échantillonnage et la connexion du sparger avec une vis plus serrée. Placer soigneusement le fermenteur dans l'autoclave. Après la stérilisation, connectez le câble de température, le câble de sonde d'OD et de pH à l'automate et connectez l'entrée d'eau à la chemise du fermenteur. Connectez toutes les connexions nécessaires entre le fermenteur et l'automate, telles que les tubes d'acide, de base et d'antimousse à la pompe péristaltique.

Ajouter une concentration optimisée de minéraux et de carbone (stérilisés de la même manière que celle décrite pour la pré-culture 1 et 2) dans le milieu de boue et maximiser l'agitation et l'aération à 600 tr / min, 2 l / min (fermenteur 3 L) 800 tr / min, 3 l / min (fermenteur 7 L) pour Étalonnage 100% DO.



Figure 5: Fermenteur à 7L du laboratoire ETE

Après l'étalonnage de l'OD, réduire l'agitation et l'aération à 300 tr / min, 0,5 l / min (fermenteur 3 L) 500 tr / min, 1 l / min (fermenteur 7 L) et dans des conditions stériles, transférer l'inoculum à 5% v / v (à vérifier) dans le fermenteur et recueillir l'échantillon après toutes les 6h jusqu'à 96h de fermentation. Pour une fermentation alimentée en discontinue, une source de carbone a été ajoutée en fonction de la consommation et une concentration optimisée de minéraux a été ajoutée toutes les 12 heures. Le fermenteur a été surveillé en continu et toutes les 3 heures, les valeurs des données du fermenteur telles que l'OD, l'agitation, le débit d'air, le pH ont été saisies sur la fiche technique.

Pour chaque échantillon de 6 h, les solides en suspension, les UFC, les PHA et la consommation de carbone ont été déterminés.

Une fois la fermentation terminée, tout le bouillon de fermentation a été collecté et stocké dans une chambre froide pour une analyse plus approfondie. Tous les tubes ont été retirés avec soin et les tubes et fermenteurs ont été nettoyés soigneusement.

2.9. Calcul

La teneur en PHA des boues a été calculée à partir de la formule suivante : teneur en

PHA (%) = g PHA / g SS x 100% où les SS ont été déterminés expérimentalement. La concentration en PHA (g / L) a été calculée en multipliant les SS (g / L) par la teneur en PHA (%)

La masse cellulaire non PHA (NPCM, g / L) a été estimée par :

NPCM (g / L) = SS (g / L) - PHA (g / L)

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. L'analyse chimique des différents paramètres du surnageant du bouillon fermenté :

Il est primordial de caractériser chimiquement le surnageant du bouillon fermenté afin de connaître les différents éléments présents dans ce dernier. Différents types de paramètres qui ont été étudiés : pH, MES, DCO, Estimation des huiles, protéines, carbone totale, azote totale, minéraux et métaux. L'étude a été faite principalement sur 3 surnageants de bouillons de fermenteur. Le **fermenteur 1** composé de glycérol purifié du bioliq (30 g/L) et des boues (15 g/L). Le **fermenteur 2** composé du glycérol purifié du bioliq (30 g/L) et le **fermenteur 3** composé des huiles de cuisson usagée enrichie en acide acétique (8 gC/L) et des boues (15 g/L).

Le glycérol brut est utilisé comme source de carbone. Pour réduire le coût, l'accent est mis sur l'utilisation des substrats de déchets disponibles comme source de carbone. Dans le glycérol brut, la concentration élevée de potassium est présente et, par conséquent, pour réduire cette concentration, l'acide phosphorique a été utilisé pour précipiter les ions potassium. Les ions potassium sont nécessaires à une concentration optimisée car une valeur accrue de potassium inhibe la synthèse de PHA.

Tableau 4: Caractéristique chimique du Bioliq et du Glycérol brute

	Glycérol brut	Glycérol brut purifié
Densité (g/L)	1385.2 ± 0.2	1241.8 ± 0.2
Glycérol (g/L)	453.2 ± 0.2	422 ± 0.2
AGL (g/L)	0	0
Méthanol (%)	0	0
Eau (%)	8.7 ± 0.4	17.3 ± 0.4
Potassium (g/L)	73.04 ± 0.3	7.6 ± 0.2
Phosphorus (g/L)	0.18 ± 0.3	23.7 ± 0.3
pH	13.5 ± 0.1	2 ± 0.1

Tableau 5: Analyse chimique du surnageant du bouillon fermenté

Échantillons	A	B	C
pH	6.78	6.32	6.01
MES (g/L)	13.2	12.6	11.3
DCO (mg/L.O₂)	29689	19200	17697
Estimation des huiles (g/L)	2	1.5	1.9
Carbone Total (g/L)	7.5	4.02	3.5
Azote Total (g/L)	1.1	0.4	
Protéines (g/L)	14.9	5.3	5.4

Les résultats indiquent que le surnageant (issus du bouillon fermenté) contient des nutriments (azote, protéines, carbone, etc.) utiles à la croissance des microorganismes. Cela est dû principalement aux transferts de ces derniers à la phase liquide après la séparation solide-liquide. Ils sont utilisés dans les différentes étapes pour la préparation de l'inoculum. Il en existe également une forte teneur en sodium dans le surnageant de bouillons fermentés issus de différentes sources de carbone (telles que les boues secondaires de pâte et papiers et d'huiles de cuisson usagées).

Cela est expliqué principalement par différents apports en teneur que ça soit en apport minéral ou comme un régulateur de pH.

Les futures expériences seront menées sur avec le surnageant du fermenteur C. Ce choix repose principalement sur les concentrations des différents composés chimiques par rapport aux autres surnageants. Une forte teneur en nutriments peut influencer l'accumulation du PHA négativement vu que cela a un effet inhibiteur sur *C. necator*. Une étude a été faite par Mozumder Garcia-Gonzalez et al., 2014 qui montre qu'une inhibition qui a affectée l'accumulation du PHA après l'ajout des sels de sodium. Ainsi, l'utilisation de déchets comme source de carbone qui est principalement le cas lors d'études antérieures de production de PHA (Mozumder et al., 2015).

3.2. Recyclage du surnageant du bouillon fermenté pour la production du PHA en fonction du ratio Eau/Surnageant (V/V) :

En effectuant une analyse chimique du surnageant du bouillon fermenté, on a pu choisir le surnageant qui va faire l'objet d'une étude du flacon agité. Le choix était principalement basé sur le surnageant qui comporte une faible teneur en minéraux qui sont susceptibles d'influencer le développement des microorganismes. La source de carbone choisie est les huiles de cuissons usées enrichies en acide acétique. 5 flacons feront l'objet de cette recherche afin d'atteindre notre objectif.

Tableau 6: Étude en Erlenmeyer sous différentes conditions

	Fiole 1	Fiole 2	Fiole 3	Fiole 4	Fiole 5
Volume de surnageant	100 % Surnageant	50% Surnageant	50% Surnageant	25% Surnageant	25% Surnageant
Source de carbone	HA	HA	HA	HA	HA
Minéraux	NA	NA	A	NA	A
Source d'Azote	A	A	A	A	A

HA : Huile Acidifiée

A : Ajoutée

NA : Non Ajoutée

3.2.1. L'évolution des microorganismes dans les fioles

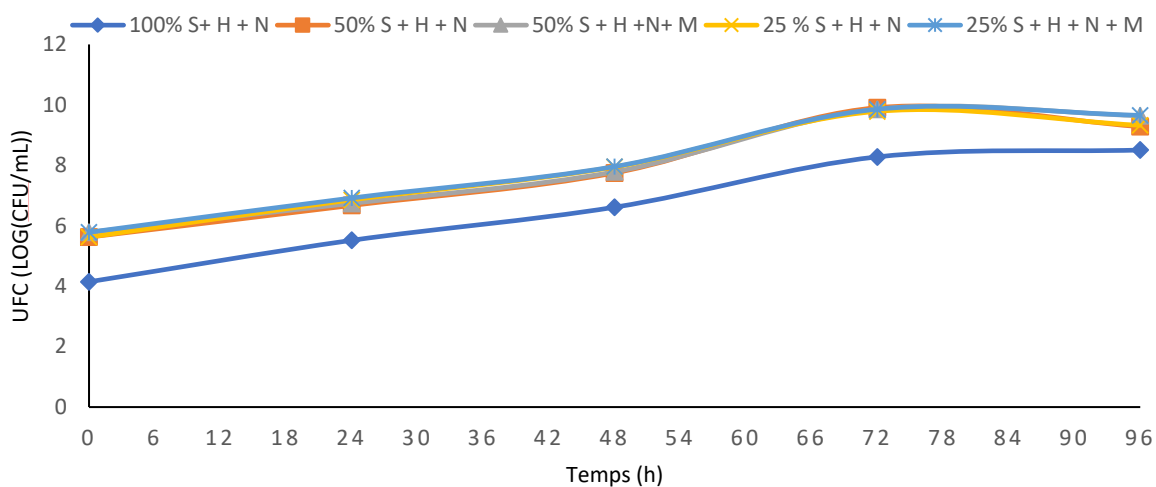


Figure 6: La variation d'UFC en fonction de différentes concentrations en surnageant du bouillon du fermenteur (LOG(UFC/mL))

Les résultats de l'analyse des métaux ont montré que le surnageant de bouillon fermenté a une concentration élevée en nutriments (plus que la concentration nécessaire à la fermentation, comme décrit ci-dessus dans la méthode). Ces nutriments sont les nutriments résiduels présents dans le bouillon fermenté qui sont perdus après l'extraction de la biomasse et du PHA. Cela peut créer des conditions qui favorisent l'inhibition de la croissance microbienne et donc la synthèse de PHA. La figure 6 montre l'évolution des cellules dans les différents flacons. Le faible nombre de cellules dans la bouteille 1 confirme les effets inhibiteurs d'une concentration élevée de nutriments sur la croissance de la synthèse de microbe et de PHA (figure 7). D'après les résultats obtenus, on peut dire que la dilution du surnageant était un choix idéal afin de réduire la teneur élevée en nutriments qui peut influencer la croissance des micro-organismes.



Figure 7: Étude Erlenmeyer

3.2.2. Fluctuation des teneurs en MES des flacons :

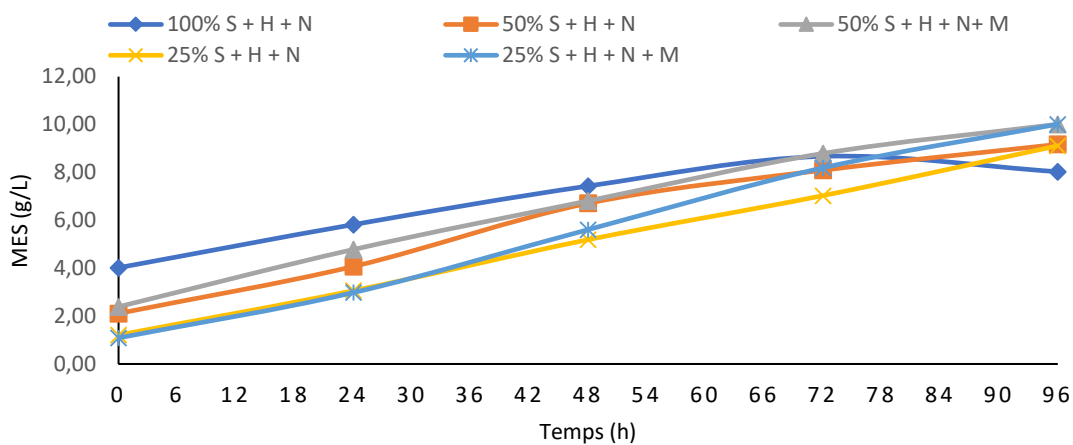


Figure 8: La variation de MES en fonction de différentes concentrations en surnageant du bouillon du fermenteur (g/L)

Les variations du nombre de cellules et de la teneur en biomasse au cours des études sur des flacons erlenmeyer montrent également l'effet inhibiteur de la concentration en nutriments présents dans les surnageants de bouillon fermenté. De plus, la diminution de la biomasse et du nombre de cellules est liée à la disponibilité des nutriments qui commenceront à s'épuiser pendant la fermentation.

Dans la figure 8, le contenu en biomasse de différentes conditions décrites dans ma méthodologie est donné. La teneur en biomasse la plus élevée (9 g / L) a été obtenue dans des conditions où la source de carbone, l'azote et les nutriments étaient ajoutés quel que soit le pourcentage de surnageant. Alors que dans d'autres conditions, la teneur en biomasse était moindre par rapport aux conditions où une source de carbone avec de l'azote et des minéraux

était utilisée. Cela explique que pendant la fermentation, les nutriments résiduels ont été épuisés et qu'il est nécessaire d'ajouter des nutriments supplémentaires pour que les microorganismes se développent et synthétisent le PHA. On pourra déduire également que le surnageant de bouillon fermenté peut être utilisé pour la production de PHA en ajoutant des minéraux supplémentaires et de l'azote avec une source de carbone. De cette façon, nous pouvons recycler le surnageant de bouillon fermenté pour la production de PHA.

3.2.3. La réduction des huiles dans les fioles :

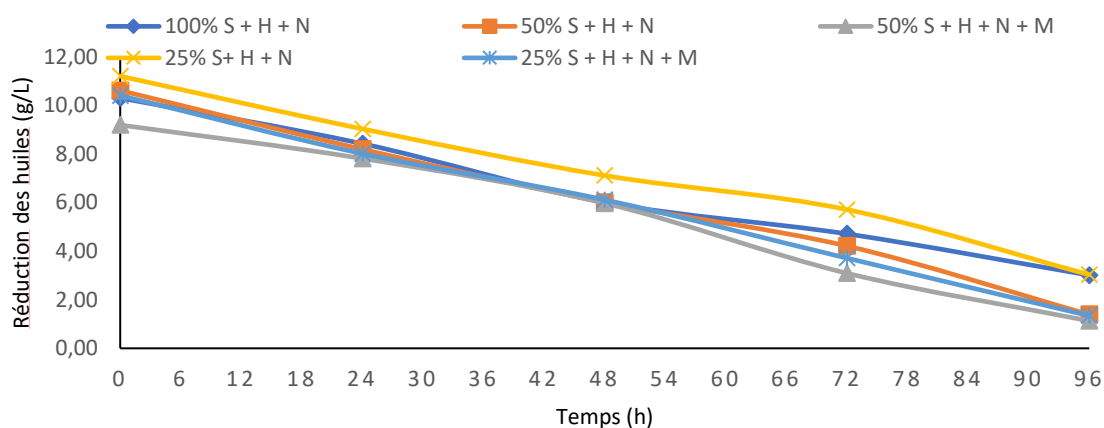


Figure 9: la variation des huiles en fonction de différentes concentrations en surnageant du bouillon du fermenteur (g/L)

Durant cette expérience, les huiles de cuisson usées enrichies par de l'acide acétique comme source de carbone ont été utilisées. Cela est utilisé comme un supplément en source de carbone en plus de celle que contient le surnageant (figure 9). Les microorganismes ont consommé le carbone incorporé dans les huiles. Sans oublier que la concentration en huiles est en diminution durant le temps de cette analyse, mais on constate que le taux des microorganismes a stagné dans les flacons à 70h. Ce dernier est directement affecté par le taux de carbone dans le milieu qui a réduit le développement des cellules.

3.2.4. L'accumulation des PHA :

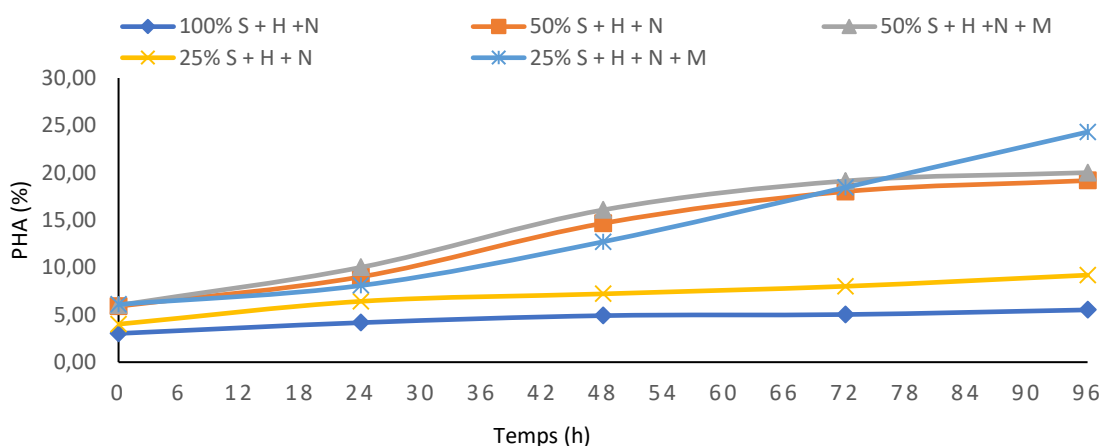


Figure 10: La variation de l'accumulation du PHA en fonction de différentes concentrations en surnageant du bouillon du fermenteur (%)

L'accumulation du PHA a varié au cours du temps. Cela est relié principalement aux conditions expérimentales de chaque cas. Le flacon 1 n'a pas montré des résultats prometteurs (figure 10) vu la forte teneur des composés chimiques et leurs répercussions sur l'inhibition de l'accumulation du PHA figure 10. Les mêmes observations ont été constatées pour le cas du flacon 4. On a utilisé que 25% du surnageant ce qui était très favorable pour un bon développement des cellules microbiennes. Cela est démontré par le fait que le flacon 5 présenté les mêmes conditions sauf que dans ce dernier, on a ajouté des minéraux ce qui a présenté des conditions optimales pour les microorganismes. La variation constatée par rapport au pourcentage en PHA accumulé est expliquée par le rajout ou non rajout des minéraux. Ce dernier est primordial pour le développement microbien dont sa nécessité dans la production de certaines enzymes.

3.3. Étude de fermentation dans des fermenteurs à 5L*2 et 7L

Les résultats obtenus au cours de la dernière analyse, nous a aidé à identifier des conditions prometteuses pour une étude au sein du fermenteur. Les résultats ont démontré qu'une dilution du surnageant est nécessaire pour sa réutilisation. Ainsi, le rajout ou non rajout des minéraux avec lesquelles nous avons obtenu un pourcentage en PHA accumulé quasiment similaires pour le cas du flacon 2 et 3.

Dans ce cas, j'ai choisi : 50 % du surnageant Avec/Sans ajout de minéraux et 25 % du surnageant avec ajout de minéraux.

Ces derniers étaient les conditions dont on a obtenu un potentiel maximum en accumulation de PHA. Ces conditions, comme mentionnées précédemment, présentent un milieu optimal pour les microorganismes où des composés qui peut nuire ou influencer la production du PHA, est faiblement concentré. D'autres parts, un rajout de l'hydroxyde de calcium, qui peut précipiter les phénols et les rendre sous forme insolubles, afin de neutraliser les toxines pouvant nuire aux microorganismes.

Afin d'atteindre mon objectif, J'ai utilisé 3 fermenteurs. Le fermenteur A avec 50 % de surnageant du bouillon de fermenteur sans addition de minéraux à 0h et le fermenteur B avec la même concentration en surnageant mais une addition des minéraux à 0h. Le fermenteur C contient 25% du surnageant du bouillon de fermenteur et l'addition des minéraux à 0h.

Un échantillonnage a été effectué chaque 6h dans le cas des différents fermenteurs. Les paramètres étudiés : MES, UFC, Estimation des huiles, Accumulation du PHA. Certains facteurs physico-chimiques ont été contrôlé lors la fermentation : pH, Agitation, OD, la température, le taux d'aération et l'antimousse.

3.3.1. Fermenteur A : 50 % du surnageant sans addition des minéraux à 0h

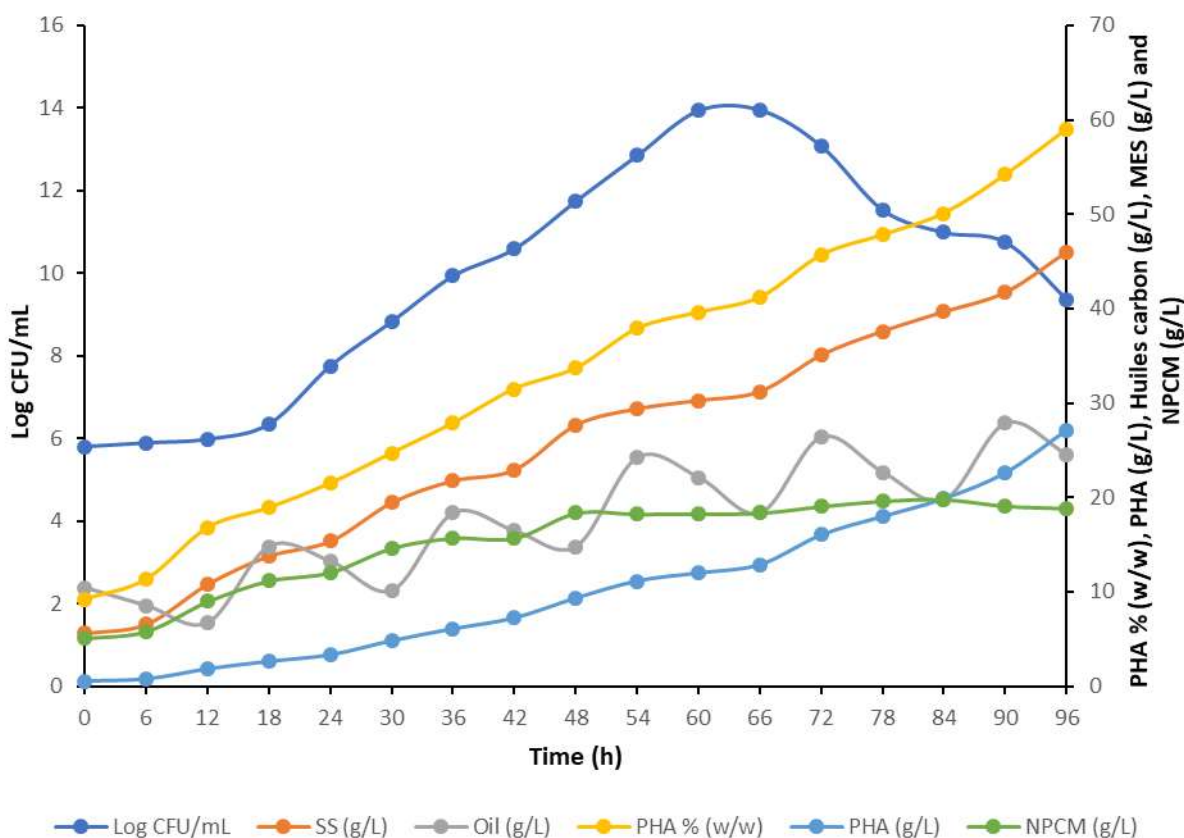


Figure 11: Évolution de la biomasse microbienne (UFC/mL), de MES (g/L) et de PHA (% (w/w) et g/L) au cours du temps d'incubation lorsque des huiles de cuisson usagées (environ 11 g/L) sont initialement utilisées comme substrat organique ainsi que 50%(v/v) de surnageant issu du bouillon fermenté et ce, sans ajout de minéraux.

La figure 11 présente les courbes résumant les résultats des analyses de MES, PHA, UFC et NPCM effectuées afin de déterminer la condition optimale de cultivation. On constate une augmentation continue des matières en suspension pour le cas du fermenteur A. C. Necator a besoin d'une source de carbone pour croître vu qu'il y a une panoplie de ressources nutritives dans le milieu. La croissance des bactéries au sein du fermenteur A était un peu faible par rapport aux autres fermenteurs. Cela est dû principalement au non rajout des minéraux à 0h. La stabilisation de MES dans un certain temps est expliquée principalement par l'épuisement de la source de carbone. Tandis que parfois les microorganismes ont besoin d'une période d'adaptation afin de croître. Sans oublier, une forte teneur en minéraux et sources de carbones pourrait avoir un effet inhibiteur de la croissance ainsi que sur l'accumulation du PHA. On

constate ainsi la fluctuation de la concentration du NPCM durant la fermentation. Les NPCM constituent des ressources en carbone d'urgence pour la bactérie.

3.3.2. Fermenteur B : 50% du surnageant avec une addition des minéraux à 0h

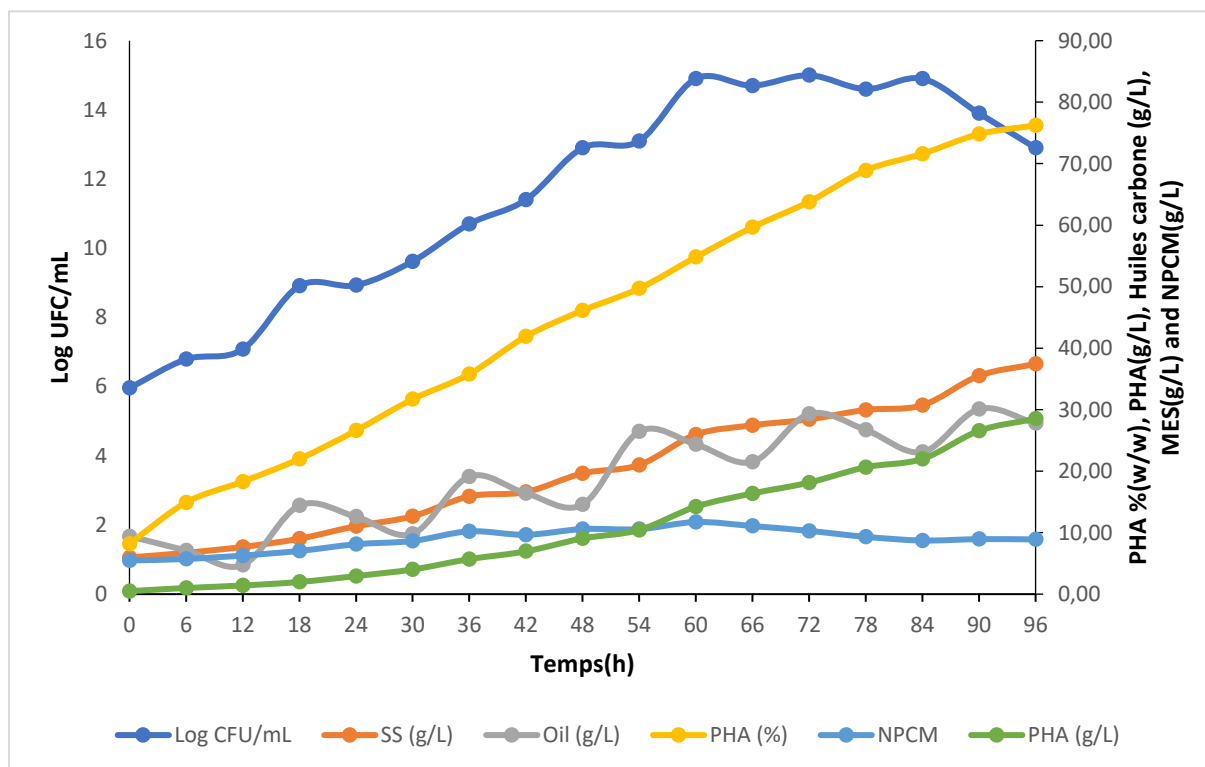


Figure 12: Évolution de la biomasse microbienne (UFC/mL), de MES (g/L) et de PHA (% (w/w) et g/L) au cours du temps d'incubation lorsque des huiles de cuisson usagées (environ 11 g/L) sont initialement utilisées comme substrat organique ainsi que 50%(v/v) de surnageant issu du bouillon fermenté et ce, avec ajout de minéraux (au début de la fermentation).

La figure 12 présente les différentes analyses chimiques et biologiques au sein du Fermenteur B. En premier temps, le développement des microorganismes était meilleur que celui du **fermenteur A**. Cela est relié directement à l'abondance des ressources nutritives. Les conditions étaient favorables à la production des PHA par les microorganismes *C.Necator*. On constate ainsi une fluctuation de la concentration du NPCM. Cela est expliqué par l'utilisation de ce dernier par les microorganismes comme une ressource en urgence d'énergie. Son utilisation est majoritairement constatée dans la période de chute des ressources en carbones. Le développement bactérien dans ces périodes est ainsi faible. Par conséquent, l'accumulation du PHA va être influencé spécialement dans ces périodes.

3.3.3. Fermenteur C : 25% du surnageant avec addition des minéraux à 0h

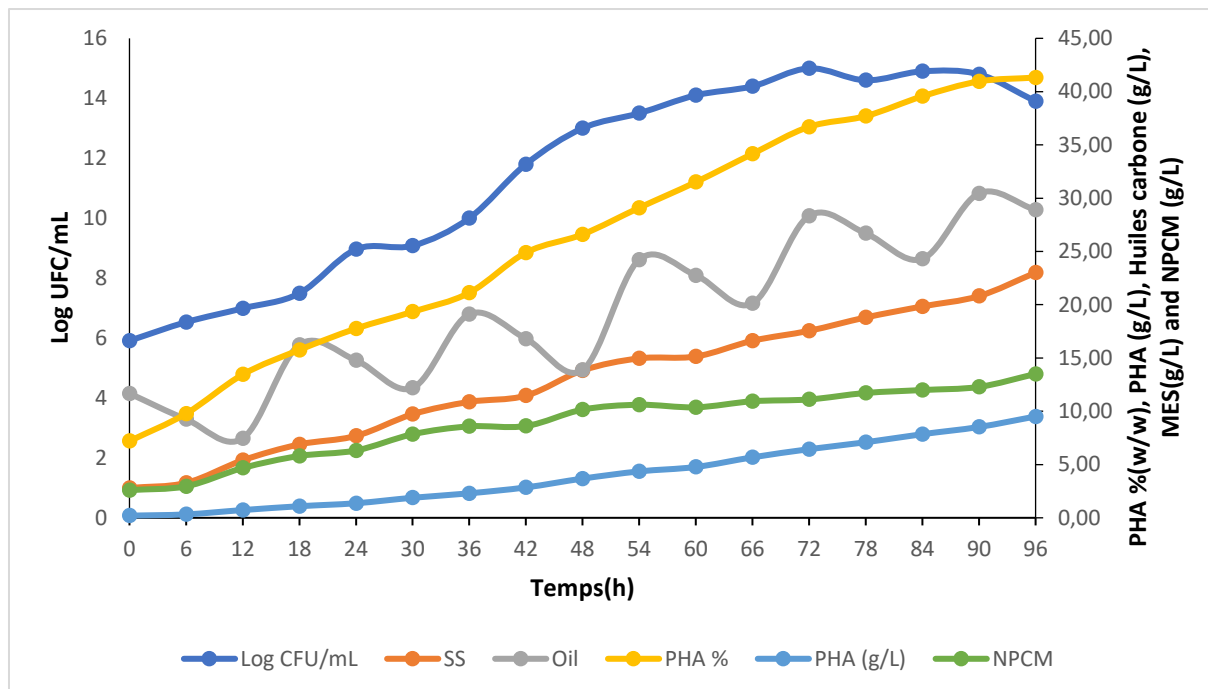


Figure 13: Évolution de la biomasse microbienne (UFC/mL), de MES (g/L) et de PHA (% w/w) et (g/L) au cours du temps d'incubation lorsque des huiles de cuisson usagées (environ 11 g/L) sont initialement utilisées comme substrat organique ainsi que 25%(v/v) de surnageant issu du bouillon fermenté et ce, avec ajout de minéraux (au début de la fermentation).

La figure 13 présente les différentes analyses biologiques et chimiques au sein du **fermenteur C**. Le développement des microorganismes était rapide durant les premières heures de fermentation. Cela est relié à une teneur acceptable en minéraux et autres composants ce qui ne pose aucune barrière face au développement microbien. Durant certaines périodes de la fermentation, on constate une stabilisation du taux de croissance des microorganismes. Cela est expliqué par la période d'adaptation des microorganismes aux fluctuations fréquentes des nutriments et des différents paramètres physico-chimiques (pH, OD, Agitation...).

CONCLUSION

La possibilité de réutiliser les rejets (issus notamment de la production de PHA) comme étant une ressource nutritive pour les microorganismes (*C. necator*), représente une alternative intéressante pouvant contribuer à réduire les coûts de production de PHA. La bioéconomie circulaire est l'une des dimensions importantes du développement durable et les bioplastiques produits à partir de substrats utilisés s'intègrent parfaitement dans le concept. En plus de la production à partir de substrats de déchets, une évaluation de la durabilité doit être réalisée en ce qui concerne l'environnement et l'économie. L'idée de « zéro émission » dans le processus de production de PHA peut être très bénéfique pour se rapprocher de la durabilité.

- (1) Les résultats obtenus à partir de l'analyse chimique des surnageants du bouillon du fermenteur a permis de déterminer le milieu favorable pour la croissance des microorganismes.
- (2) Les résultats obtenus en Erlenmeyer sont plus favorables en effectuant une dilution du surnageant à 50% et 25%.
- (3) Suite aux résultats des tests en fiole agitée, une série d'essais ont été menés en fermenteur. Ces tests ont été menés dans trois différentes conditions expérimentales :
 - a. **Fermenteur A** : 50% du surnageant sans l'addition des minéraux à 0h,
 - b. **Fermenteur B** : 50% du surnageant avec l'addition des minéraux à 0h ;
 - c. **Fermenteur C** : 25% du surnageant avec l'addition des minéraux à 0h.
- (4) Les résultats obtenus au niveau du fermenteur B sont encourageants et montrent un taux de productivité élevée (76,23%) en PHA. La croissance exponentielle des cellules bactériennes au sein du fermenteur B était moins prolongée que celle des autres fermenteurs. Le développement bactéries ($6,20^{E+05}$, $7,60^{E+05}$, $9,40^{E+05}$ UFC/mL), ($9,10^{E+05}$, 6.20^{E+06} , $1,20^{E+07}$ UFC/mL), (8.10^{E+05} , 3.40^{E+06} , 9.70^{E+06} UFC/mL) à 12h respectivement pour le **Fermenteur A**, **Fermenteur B** et **Fermenteur C**.
- (5) Le rendement de productivité en PHA est plus important dans le cas du Fermenteur B (76,23% en PHA) comparativement au Fermenteur A (59,01% en PHA).
- (6) Le taux de croissance bactérienne ($4,20^{E+15}$ UFC/mL à 78h) est plus élevé au sein du Fermenteur B.

RECOMMANDATIONS

Il est souhaitable que les prochaines recherches sur le projet de recyclage des flux de rejets de la production du bioplastique considèrent les recommandations suivantes :

- 1) Une investigation par rapport aux agents inhibiteurs qui impactent les microorganismes ;
- 2) La substitution du Na^+ (régulateur de pH, minéraux...) par Ca^{2+} ;
- 3) L'investigation sur la récupération des produits à valeurs ajoutées au sein du bouillon de fermenteurs (Lipide microbien, Protéine, EPS, etc.) ;
- 4) Une recherche pertinente destinée à comprendre et résoudre le mécanisme derrière l'effet de latence affectant le développement microbien dans le fermenteur ;
- 5) L'investigation sur l'augmentation des périodes d'alimentation (de 6h à 3h).

RÉFÉRENCES

- Ahn J, Jho EH, Nam K, Ahn J, Jho EH & Nam K (2015) Effect of C/N ratio on polyhydroxyalkanoates (PHA) accumulation by *Cupriavidus necator* and its implication on the use of rice straw hydrolysates. *Environmental Engineering Research* 20(3):246-253.
- Al-Battashi H, Annamalai N, Al-Kindi S, Nair AS, Al-Bahry S, Verma JP & Sivakumar N (2019) Production of bioplastic (poly-3-hydroxybutyrate) using waste paper as a feedstock: Optimization of enzymatic hydrolysis and fermentation employing *Burkholderia sacchari*. *Journal of Cleaner Production* 214:236-247.
- Anis SNS, Iqbal NM, Kumar S & Amirul A-A (2013) Effect of different recovery strategies of P (3HB-co-3HHx) copolymer from *Cupriavidus necator* recombinant harboring the PHA synthase of *Chromobacterium* sp. USM2. *Separation and Purification Technology* 102:111-117.
- Aramvash A, Gholami-Banadkuki N, Moazzeni-Zavareh F & Hajizadeh-Turchi S (2015) An environmentally friendly and efficient method for extraction of PHB biopolymer with non-halogenated solvents. *J Microbiol Biotechnol* 25(11):1936-1943.
- Aramvash A, Gholami-Banadkuki N & Seyedkarimi MS (2016) An efficient method for the application of PHA-poor solvents to extract polyhydroxybutyrate from *Cupriavidus necator*. *Biotechnology progress* 32(6):1480-1486.
- Bhattacharyya A, Saha J, Haldar S, Bhowmic A, Mukhopadhyay UK & Mukherjee J (2014) Production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei* using rice-based ethanol stillage with simultaneous recovery and re-use of medium salts. *Extremophiles* 18(2):463-470.
- Bowers T, Vaidya A, Smith DA & Lloyd-Jones G (2014) Softwood hydrolysate as a carbon source for polyhydroxyalkanoate production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 89(7):1030-1037.
- Braunegg G, Bona R & Koller M (2004) Sustainable polymer production. *Polymer-plastics technology and engineering* 43(6):1779-1793.
- Bugnicourt E, Cinelli P, Lazzeri A & Alvarez VA (2014) Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging.
- Cesário MT, Raposo RS, de Almeida MCM, van Keulen F, Ferreira BS & da Fonseca MMR (2014) Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates. *New biotechnology* 31(1):104-113.
- Chee J-Y, Yoga S-S, Lau N-S, Ling S-C, Abed RM & Sudesh K (2010) Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA): converting renewable resources into bioplastics. *Current research, technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* 2:1395-1404.
- Chen G-Q (2009) A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio-and materials industry. *Chemical Society Reviews* 38(8):2434-2446.
- Choi J-i & Lee SY (1997) Process analysis and economic evaluation for poly (3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Engineering* 17(6):335-342.
- Davis R, Kataria R, Cerrone F, Woods T, Kenny S, O'Donovan A, Guzik M, Shaikh H, Duane G & Gupta VK (2013) Conversion of grass biomass into fermentable sugars and its utilization for medium chain length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) production by *Pseudomonas* strains. *Bioresource technology* 150:202-209.
- Dawes EA & Senior PJ (1973) The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Advances in microbial physiology*, Elsevier, Vol 10. p 135-266.
- Dietrich K, Dumont M-J, Del Rio LF & Orsat V (2017) Producing PHAs in the bioeconomy—Towards a sustainable bioplastic. *Sustainable production and consumption* 9:58-70.

- Dionisi D, Carucci G, Papini MP, Riccardi C, Majone M & Carrasco F (2005) Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. *Water research* 39(10):2076-2084.
- Doi Y (1990) *Microbial polyesters*. Vch,
- Du C, Sabirova J, Soetaert W & Ki Carol Lin S (2012) Polyhydroxyalkanoates production from low-cost sustainable raw materials. *Current Chemical Biology* 6(1):14-25.
- Ebnesajjad S (2012) *Handbook of biopolymers and biodegradable plastics: properties, processing and applications*. William Andrew,
- El-Hadi A, Schnabel R, Straube E, Müller G & Henning S (2002) Correlation between degree of crystallinity, morphology, glass temperature, mechanical properties and biodegradation of poly (3-hydroxyalkanoate) PHAs and their blends. *Polymer testing* 21(6):665-674.
- Emadian SM, Onay TT & Demirel B (2017) Biodegradation of bioplastics in natural environments. *Waste management* 59:526-536.
- Faccin DJL, Martins I, Cardozo NSM, Rech R, Ayub MAZ, Alves TLM, Gambetta R & Resende Secchi A (2009) Optimization of C: N ratio and minimal initial carbon source for poly (3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 84(12):1756-1761.
- Fei T, Cazeneuve S, Wen Z, Wu L & Wang T (2016) Effective recovery of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biopolymer from *C. upriavidus necator* using a novel and environmentally friendly solvent system. *Biotechnology progress* 32(3):678-685.
- Gowda V & Shivakumar S (2014) Agrowaste-based Polyhydroxyalkanoate (PHA) production using hydrolytic potential of *Bacillus thuringiensis* IAM 12077. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 57(1):55-61.
- Grothe E & Chisti Y (2000) Poly (β -hydroxybutyric acid) thermoplastic production by *Alcaligenes latus*: behavior of fed-batch cultures. *Bioprocess Engineering* 22(5):441-449.
- Hokamura A, Yunoue Y, Goto S & Matsusaki H (2017) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate from steamed soybean wastewater by a recombinant strain of *Pseudomonas* sp. 61-3. *Bioengineering* 4(3):68.
- Jindal P & Tiwari D (2013) Biosynthesis of PHA and its copolymers—a review. *Int. J. Sci. Eng. Res* 4(8):501-507.
- Kachrimanidou V, Kopsahelis N, Vlysidis A, Papanikolaou S, Kookos IK, Martínez BM, Rondán MCE & Koutinas AA (2016) Downstream separation of poly (hydroxyalkanoates) using crude enzyme consortia produced via solid state fermentation integrated in a biorefinery concept. *Food and bioprocess processing* 100:323-334.
- Kasuya K-i, Inoue Y, Yamada K & Doi Y (1995) Kinetics of surface hydrolysis of poly [(R)-3-hydroxybutyrate] film by PHB depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1. *Polymer degradation and stability* 48(1):167-174.
- Keenan TM, Tanenbaum SW, Stipanovic AJ & Nakas JP (2004) Production and Characterization of Poly- β -hydroxyalkanoate Copolymers from *Burkholderia cepacia* Utilizing Xylose and Levulinic Acid. *Biotechnology progress* 20(6):1697-1704.
- Kleerebezem R & van Loosdrecht MC (2007) Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Current opinion in biotechnology* 18(3):207-212.
- Koller M (2017) Advances in polyhydroxyalkanoate (PHA) production. (Multidisciplinary Digital Publishing Institute).
- Koller M, Niebelschütz H & Braunegg G (2013) Strategies for recovery and purification of poly [(R)-3-hydroxyalkanoates](PHA) biopolyesters from surrounding biomass. *Engineering in Life Sciences* 13(6):549-562.
- Koning Gd (1995) Physical properties of bacterial poly ((R)-3-hydroxyalkanoates). *Canadian journal of Microbiology* 41(13):303-309.
- Kourmentza C, Koutra E, Venetsaneas N & Kornaros M (2017) Integrated biorefinery approach for the valorization of olive mill waste streams towards sustainable biofuels and bio-based products. *Microbial Applications Vol. 1*, Springer. p 211-238.

- Kucera D, Benesova P, Ladicky P, Pekar M, Sedlacek P & Obruca S (2017) Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolyzates of spruce sawdust: Comparison of hydrolyzates detoxification by application of overliming, active carbon, and lignite. *Bioengineering* 4(2):53.
- Kunasundari B, Arza CR, Maurer FH, Murugaiyah V, Kaur G & Sudesh K (2017) Biological recovery and properties of poly (3-hydroxybutyrate) from *Cupriavidus necator* H16. *Separation and Purification Technology* 172:1-6.
- Kunasundari B, Murugaiyah V, Kaur G, Maurer FH & Sudesh K (2013) Revisiting the single cell protein application of *Cupriavidus necator* H16 and recovering bioplastic granules simultaneously. *PloS one* 8(10):e78528.
- Leong YK, Lan JC-W, Loh H-S, Ling TC, Ooi CW & Show PL (2017) Cloud-point extraction of green-polymers from *Cupriavidus necator* lysate using thermoseparating-based aqueous two-phase extraction. *Journal of bioscience and bioengineering* 123(3):370-375.
- Lopes MSG, Gosset G, Rocha RCS, Gomez JGC & da Silva LF (2011) PHB biosynthesis in catabolite repression mutant of *Burkholderia sacchari*. *Current microbiology* 63(4):319.
- López NI, Pettinari MJ, Nickel PI & Méndez BS (2015) Polyhydroxyalkanoates: much more than biodegradable plastics. *Advances in applied microbiology*, Elsevier, Vol 93. p 73-106.
- Madkour MH, Heinrich D, Alghamdi MA, Shabbaj II & Steinbüchel A (2013) PHA recovery from biomass. *Biomacromolecules* 14(9):2963-2972.
- Martinez GA, Bertin L, Scoma A, Rebecchi S, Braunegg G & Fava F (2015) Production of polyhydroxyalkanoates from dephenolised and fermented olive mill wastewaters by employing a pure culture of *Cupriavidus necator*. *Biochemical engineering journal* 97:92-100.
- Miller RA, Brady JM & Cutright DE (1977) Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios. *Journal of biomedical materials research* 11(5):711-719.
- Mozumder MSI, De Wever H, Volcke EI & Garcia-Gonzalez L (2014) A robust fed-batch feeding strategy independent of the carbon source for optimal polyhydroxybutyrate production. *Process Biochemistry* 49(3):365-373.
- Mozumder MSI, Garcia-Gonzalez L, De Wever H & Volcke EI (2015) Effect of sodium accumulation on heterotrophic growth and polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator*. *Bioresource technology* 191:213-218.
- Murugan P, Han L, Gan C-Y, Maurer FH & Sudesh K (2016) A new biological recovery approach for PHA using mealworm, *Tenebrio molitor*. *Journal of biotechnology* 239:98-105.
- Nduko JM, Suzuki W, Matsumoto Ki, Kobayashi H, Ooi T, Fukuoka A & Taguchi S (2012) Polyhydroxyalkanoates production from cellulose hydrolysate in *Escherichia coli* LS5218 with superior resistance to 5-hydroxymethylfurfural. *Journal of bioscience and bioengineering* 113(1):70-72.
- Neves A & Müller J (2012) Use of enzymes in extraction of polyhydroxyalkanoates produced by *Cupriavidus necator*. *Biotechnology progress* 28(6):1575-1580.
- Obruca S, Benesova P, Petrik S, Oborna J, Prikryl R & Marova I (2014) Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds. *Process Biochemistry* 49(9):1409-1414.
- Pais J, Serafim LS, Freitas F & Reis MA (2016) Conversion of cheese whey into poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *New biotechnology* 33(1):224-230.
- Pan W, Nomura CT & Nakas JP (2012a) Estimation of inhibitory effects of hemicellulosic wood hydrolysate inhibitors on PHA production by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 using response surface methodology. *Bioresource technology* 125:275-282.
- Pan W, Perrotta JA, Stipanovic AJ, Nomura CT & Nakas JP (2012b) Production of polyhydroxyalkanoates by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 using a detoxified

- sugar maple hemicellulosic hydrolysate. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 39(3):459-469.
- Quillaguamán J, Guzmán H, Van-Thuoc D & Hatti-Kaul R (2010) Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Applied microbiology and biotechnology* 85(6):1687-1696.
- Radhika D & Murugesan A (2012) Bioproduction, statistical optimization and characterization of microbial plastic (poly 3-hydroxy butyrate) employing various hydrolysates of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) as sole carbon source. *Bioresource technology* 121:83-92.
- Rummel CD, Löder MG, Fricke NF, Lang T, Griebeler E-M, Janke M & Gerdt G (2016) Plastic ingestion by pelagic and demersal fish from the North Sea and Baltic Sea. *Marine pollution bulletin* 102(1):134-141.
- Salamanca-Cardona L, Ashe CS, Stipanovic AJ & Nomura CT (2014) Enhanced production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from beechwood xylan by recombinant *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology* 98(2):831-842.
- Samorì C, Abbondanzi F, Galletti P, Giorgini L, Mazzocchetti L, Torri C & Tagliavini E (2015) Extraction of polyhydroxyalkanoates from mixed microbial cultures: impact on polymer quality and recovery. *Bioresource technology* 189:195-202.
- Sathesh Prabu C & Murugesan A (2010) Effective Utilization and Management of Coir Industrial waste for the Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) using the Bacterium *Azotobacter Beijerinckii*. *International Journal of Environmental Research* 4(3):519-524.
- Serafim LS, Lemos PC, Albuquerque MG & Reis MA (2008) Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Applied microbiology and biotechnology* 81(4):615-628.
- Sindhu R, Silviya N, Binod P & Pandey A (2013) Pentose-rich hydrolysate from acid pretreated rice straw as a carbon source for the production of poly-3-hydroxybutyrate. *Biochemical engineering journal* 78:67-72.
- Singh AK, Srivastava JK, Chandel AK, Sharma L, Mallick N & Singh SP (2019) Biomedical applications of microbially engineered polyhydroxyalkanoates: an insight into recent advances, bottlenecks, and solutions. *Applied microbiology and biotechnology* 103(5):2007-2032.
- Steinbüchel A (2001) Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. *Macromolecular Bioscience* 1(1):1-24.
- Steinbüchel A, Hustede E, Liebergesell M, Pieper U, Timm A & Valentin H (1992) Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. *FEMS microbiology reviews* 9(2-4):217-230.
- Sudesh K, Abe H & Doi Y (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in polymer science* 25(10):1503-1555.
- Tay B-Y, Lokesh BE, Lee C-Y & Sudesh K (2010) Polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulating bacteria from the gut of higher termite *Macrotermes carbonarius* (Blattodea: Termitidae). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(6):1015-1024.
- Urtuvia V, Villegas P, González M & Seeger M (2014) Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *International journal of biological macromolecules* 70:208-213.
- Valentin HE, Broyles DL, Casagrande LA, Colburn SM, Creely WL, DeLaquil PA, Felton HM, Gonzalez KA, Houmiel KL & Lutke K (1999) PHA production, from bacteria to plants. *International Journal of Biological Macromolecules* 25(1-3):303-306.
- Verlinden RA, Hill DJ, Kenward MA, Williams CD, Piotrowska-Seget Z & Radecka IK (2011) Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*. *AMB express* 1(1):11.
- Villano M, Valentino F, Barbetta A, Martino L, Scandola M & Majone M (2014) Polyhydroxyalkanoates production with mixed microbial cultures: from culture

- selection to polymer recovery in a high-rate continuous process. *New biotechnology* 31(4):289-296.
- Volova T, Boyandin A, Vasil'ev A, Karpov V, Kozhevnikov I, Prudnikova S, Rudnev V, Xuân BB, Dũng VV & Gitel'Zon I (2011) Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in the South China Sea and identification of PHA-degrading bacteria. *Microbiology* 80(2):252.
- Ward PG, Goff M, Donner M, Kaminsky W & O'Connor KE (2006) A two step chemo-biotechnological conversion of polystyrene to a biodegradable thermoplastic. *Environmental science & technology* 40(7):2433-2437.
- Yang TH, Kim TW, Kang HO, Lee SH, Lee EJ, Lim SC, Oh SO, Song AJ, Park SJ & Lee SY (2010) Biosynthesis of polylactic acid and its copolymers using evolved propionate CoA transferase and PHA synthase. *Biotechnology and bioengineering* 105(1):150-160.
- Yang Y-H, Jeon J-M, Kim J-H, Seo H-M, Rha C, Sinskey AJ & Brigham CJ (2015) Application of a non-halogenated solvent, methyl ethyl ketone (MEK) for recovery of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)[P (HB-co-HV)] from bacterial cells. *Biotechnology and bioprocess engineering* 20(2):291-297.
- Zhang Y, Sun W, Wang H & Geng A (2013) Polyhydroxybutyrate production from oil palm empty fruit bunch using *Bacillus megaterium* R11. *Bioresource technology* 147:307-314.

Annexe 1

Tableau 7: Analyse chimique du bouillon fermenté

Échantillons (mg/L)	Limite de détection	1	2	3
Aluminium	0,008	0,4	0,33	0,38
Arsenic	0,008	< 0,016	< 0,016	< 0,016
Bore	0,0015	0,623	0,538	0,376
Barium	0,0002	0,0156	0,0102	0,0158
Calcium	0,00007	4,18	8,78	15,6
Cadmium	0,00025	0,0007	0,0015	0,0008
Cobalt	0,0008	< 0,0016	< 0,0016	< 0,0016
Chrome	0,0007	0,0135	0,022	0,0189
Cuivre	0,0014	15,4	4,39	0,399
Fer	0,0022	0,525	0,535	0,27
Potassium	0,0007	195	94,1	65,2
Magnésium	0,0014	11,1	5,42	6,4
Manganèse	0,00011	0,0427	0,0175	0,0255
Molybdène	0,002	< 0,004	0,007	< 0,044
Sodium	0,00028	602	462	387
Nickel	0,0013	0,058	0,089	0,031
Phosphore	0,017	356	122	72,5
Plomb	0,004	0,37	0,14	0,03
Soufre	0,027	86,5	206	232
Antimoine	0,003	0,02	0,009	< 0,006
Scandium	0,00017	0,0006	< 0,00034	0,0004
Sélénium	0,017	< 0,034	< 0,034	< 0,034
Silicium	0,0021	19,9	5,23	15,9
Étain	0,016	3,2	3	2,5
Strontium	0,00018	0,0155	0,0167	0,03
Thallium	0,0006	0,0093	0,0086	0,0087
Vanadium	0,0004	< 0,0008	< 0,0008	< 0,0008
Zinc	0,0003	0,564	0,204	0,052